

Expression  
der Poren bildenden Hämolysine  
Listeriolysin und TlyA in  
*Mycobacterium smegmatis*

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sven Berger  
aus Köln

Köln, Januar 2002

1. Referent: Prof. Dr. Michael Melkonian

2. Referent: Prof. Dr. Martin Krönke

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Mai 2002

“To understand  
the mechanisms by which a bacterial pathogen  
circumvents the immune system and causes disease, one has to  
identify those bacterial gene products that are specifically  
required for each stage of the infection process”

Michael J. Mahan,  
James M. Slauach &  
John J. Mekalanos  
(1996)

Für Beatrix

1	Einleitung.....	10
1.1	Mykobakterien.....	10
1.2	Phagozytose von Mykobakterien durch Makrophagen .....	11
1.3	Das Phagosom von <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> und <i>M. avium</i> in humanen und murinen Makrophagen .....	12
1.3.1	Phagosomaler pH.....	13
1.4	Differenzielle Genexpression .....	14
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	15
2	Material und Methoden .....	17
2.1	Geräte.....	17
2.2	Chemikalien.....	17
2.3	Oligonukleotide .....	18
2.4	Plasmide.....	20
2.5	Amplifikation von DNA mittels PCR .....	21
2.6	Bakterienstämme und Zelllinien.....	22
2.7	Klonierungsmethoden.....	22
2.7.1	Aufreinigung von DNA .....	22
2.7.2	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten .....	22
2.7.3	Enzyme .....	22
2.7.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	23
2.7.5	Transformation kompetenter <i>M. smegmatis</i> -Zellen.....	23
2.8	Kulturmedien .....	24
2.9	Antibiotika .....	24
2.10	Herstellung von HMDM-Kulturen (human monocyte-derived macrophages) ..	24
2.11	Infektion von Makrophagen .....	25
2.12	Überlebensraten .....	26
2.13	Laser- und Fluoreszenzmikroskopie.....	27
2.13.1	Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen.....	27
2.13.2	Antikörperfärbung .....	27
2.14	Messung des phagosomalen pH-Wertes.....	28
2.15	Elektronenmikroskopie.....	30
2.16	Westernblot.....	31
2.16.1	Protein-Konzentrations-Bestimmung .....	31
2.16.2	Immunodetektion.....	31
2.16.3	Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran .....	31
2.16.4	Proteinnachweis durch Immunodetektion .....	32
2.17	Konstruktion der genomischen DNA-Bank und Identifizierung phagosomal- induzierter Promotoren .....	32
2.17.1	Isolierung genomischer DNA und Partialverdau mit Sau3A .....	32
2.17.2	Screening der genomischer DNA-Banken .....	33
2.18	Messung der Promotorstärke .....	35
2.18.1	Konstruktion der Vektoren zur Messung der Promotorstärke.....	35
2.18.2	<i>lacZ/luxAB</i> Nachweis .....	35
2.18.3	Quantifizierung der GFP-Konzentration .....	36
2.19	Computeranalyse .....	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Klonierung des <i>tlyA</i> .....	38

3.2	Überlebensraten von <i>hly</i> - und <i>tlyA</i> -exprimierenden <i>M. smegmatis</i> -Transformanten in Makrophagenkulturen .....	39
3.3	Zytotoxizität der Hämolsine auf Makrophagen .....	42
3.4	Antikörpernachweis von Lamp-1 und Transferrin-Rezeptor .....	43
3.5	Elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	49
3.6	Phagosomaler pH .....	55
3.7	TlyA Fusionsprotein .....	61
3.8	Vergleich der Aminosäuresequenz von TlyA verschiedener Arten .....	63
3.9	Anwendung des Listeriolysin bedingten Überlebensvorteils zur Identifizierung von phagosomal-induzierten Promotoren .....	67
3.9.1	Herstellung eines Streptomycin resistenten <i>M. smegmatis</i> -Stamms .....	67
3.9.2	Konstruktion des Vektors pTRAP und Testen seiner Komponenten .....	67
3.9.3	Konstruktion und Durchsuchen der genomischen DNA-Banken mit dem Vektor pTRAP .....	71
3.9.4	Untersuchung der isolierten Klone .....	71
3.9.5	Untersuchung der isolierten Promotoren .....	73
3.10	Promotorstärkemessung .....	78
3.10.1	Konstruktion der Vektoren zur Promotorstärkemessung und Klonierung mykobakterieller Promotoren .....	78
3.10.2	Messung der Promotorstärke .....	80
4	Diskussion .....	88
4.1	Überlebensrate und Zytotoxizität .....	88
4.2	Phagosomaler pH .....	93
4.3	Präsenz und Permeabilität der phagosomalen Membran .....	94
4.4	Suche nach phagosomal-induzierten Promotoren .....	99
4.5	Induktion von mykobakteriellen Promotoren durch Mikromilieufaktoren .....	104
4.6	Extrazelluläre und intrazelluläre Promotorstärken .....	105
5	Danksagung .....	107
6	Literatur .....	108

## Abkürzungen und Erklärungen

AttP	Hybridisierungsstelle für den Mykobakterienphagen L5 (Lee et al., 1991)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CFU (colony forming units)	Kolonie-bildende Einheiten
FITC	Fluorescein
GFP (Green Fluorescent Protein)	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HMDM (human monocyte-derived macrophages)	Humane Makrophagen, die sich aus Monozyten differenziert haben. Die Monozyten wurden aus Blut isoliert.
HRP (horse radish peroxidase)	Meerrettich-Peroxidase
HRP-GAM (Horse Radish Peroxidase - Goat Anti-Mouse)	Zweitantikörper aus Ziege gegen Maus gekoppelt mit HRP
LB	Luria Bertani-Medium
M	Molar (Mol/l)
min	Minuten
ml	Milliliter
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ORF	Offenes Leseraster
Ori (origin of replication)	Replikationsstartpunkt eines Plasmids
pAL5000	Replikationsursprung von mykobakteriellem Plasmid (Ranes et al., 1990; Rauzier et al., 1988)
PCR (polymerase chain reaction)	Polymerasekettenreaktion
P <sub>Gen</sub>	Promotor stromaufwärts des entsprechenden Gens
RFP (Red Fluorescent Protein)	Rot fluoreszierendes Protein
S.	Seite
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
ü.N.	über Nacht
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der beiden Poren bildenden Hämolyse Listeriolysin aus *Listeria monocytogenes* und *tlyA* aus *Mycobacterium tuberculosis* auf das Überleben von *Mycobacterium smegmatis* in Makrophagen untersucht und die Faktoren charakterisiert, die für das intrazelluläre Überleben relevant sind.

Für diese Untersuchungen wurden Transformanten hergestellt, die diese Gene konstitutiv exprimieren. Die Überlebensrate dieser Transformanten wurde mit der Überlebensrate verschiedener anderer Transformanten, die diese Gene nicht exprimieren, verglichen. Sowohl *tlyA*- als auch *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen zeigen intrazellulär eine erhöhte Überlebensrate. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Erhöhung der Überlebensrate nicht auf die Auflösung der phagosomalen Membran zurückzuführen ist. Die Phagosomen sowohl vom Wildtyp als auch von *M. smegmatis*-Transformanten weisen geringere Mengen des Transferrin-Rezeptors auf, als Phagosomen von *M. bovis* BCG. Dieses Fehlen des Transferrin-Rezeptors und die Fusion von frühen Endosomen mit dem Phagosomen, die für *tlyA*- und *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen festgestellt wurde, sind Merkmale für den Reifungsprozess der Phagosomen. Es wurde ein für das intrazelluläre Überleben wichtiger Zusammenhang zwischen der Expression von *tlyA* und *hly* einerseits und dem phagosomalen pH-Wert andererseits festgestellt. Im Vergleich mit dem phagosomalen pH-Wert des Wildtyps ist er bei *tlyA*- und *hly*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen signifikant erhöht. Dies ist die erste Arbeit, die einen Zusammenhang zwischen dem phagosomalen pH-Wert und einem definierten mykobakteriellen Gen herstellt.

Mit Hilfe eines promotorlosen *hly*-Genes konnte in *M. smegmatis* ein System aufgebaut werden, das die Isolierung von Promotoren ermöglicht, die im Phagosom zu einer erhöhten Expressionsrate führen. Durch dieses System wurden zwei Promotoren isoliert. Dabei handelt es sich um den Promotor stromaufwärts des *ahpC*-Genes und einen Promotor stromaufwärts eines bisher unbekannten Genes. Beide isolierten Promotoren weisen auch extrazelluläre Aktivität auf. Es wurden zwei weitere Systeme hergestellt, mit deren Hilfe die intrazelluläre Promotoraktivität in Mykobakterien gemessen werden kann. Für den *ahpC*-Promotor ließ sich eine signifikante Induktion durch das Mikromilieu des Phagosoms aufzeigen. Für den bisher unbekannten Promotor konnte eine vergleichbare Induktion nicht gezeigt werden. Die Aktivität der isolierten Promotoren wurde mit anderen mykobakteriellen Promotoren verglichen. Von den untersuchten Promotoren weist der *ahpC*-Promotor die stärkste intrazelluläre Aktivität 8 h nach Infektion auf. Damit ist der *ahpC*-Promotor hervorragend geeignet, um Gene intrazellulär über einen längeren Zeitraum in *M. smegmatis* zu exprimieren.



Die Induktion von mykobakteriellen Promotoren durch das Mikromilieu des Phagosoms konnte auch bei *M. smegmatis* festgestellt werden. Phagosomal-induzierte Promotoren von *M. smegmatis* wurden erstmalig in dieser Arbeit identifiziert.

## Abstract

In this study the impact of the pore-forming haemolysins *hly* and *tlyA* on the survival of *M. smegmatis* in macrophages was investigated. The relevant factors for the intracellular survival were characterised.

For these experiments two transformants were constructed which express these genes constitutively. The survival rate of these transformants was compared to other transformants that do not express these genes. Both *tlyA* and the *hly* expressing *M. smegmatis* cells show an increased intracellular survival. The increased survival was not due to a phagosomal escape as proven by electron microscopic studies. The phagosomes of all transformants show a minor concentration of the transferrin receptor in comparison to the phagosomes of *M. bovis* BCG. The lack of this receptor and the fusion of early endosomes with the phagosomes are indications of the maturation process of the phagosome. A correlation between the expression of *tlyA* and *hly* on one hand, and the phagosomal pH on the other, was found and this correlation is important for the intracellular survival. The phagosomal pH is significantly higher in *tlyA* and *hly* expressing transformants than in the wildtype. In this study the correlation between the phagosomal pH and a specific mycobacterial gene was shown for the first time.

Using a promoterless *hly* gene, a system was constructed, which enabled the isolation of promoters in *M. smegmatis* that cause a higher expression rate in phagosomes. The application of this system resulted in the isolation of two promoters. They were identified as the *ahpC*-promoter and a promoter upstream of an unknown gene. Both promoters have an extra cellular activity. Two additional systems were build up to measure the intracellular promoter activity in mycobacteria. A significant induction by the phagosomal environment was measured. For the unknown promoter a comparable induction could not be found. The activity of the isolated promoters was compared with other mycobacterial promoters. The *ahpC*-promoter showed the strongest intracellular activity of all the investigated promoters, 8 h after infection. Therefore the *ahpC*-promoter in *M. smegmatis*, is especially suited for gene expression intracellularly over a longer time period.

By these experiments an induction of promoters, which are induced in pathogenic mycobacteria could be detected in *M. smegmatis*, too. Promoters of *M. smegmatis*, which are induced by the phagosomal environment, were identified in this study for the first time.

# 1 Einleitung

## 1.1 Mykobakterien

Die Gattung *Mycobacterium* gehört zu den nicht-mycelartig wachsenden Vertretern der Actinomycetales. Gattungsspezifische Merkmale sind die langkettigen Mycolsäuren in der Zellwand und der hohe Anteil an Guanin und Cytosin an der DNA (Levy-Frebault & Portaels, 1992; Shinnick & Good, 1994). Die Zellwandbeschaffenheit macht die Zellen säurestabil und wird beim Nachweis dieser Mikroorganismen genutzt. Die Mykobakterien werden anhand der Wachstumsrate in langsam-wachsende und schnell-wachsende Mykobakterien unterteilt (Shinnick & Good, 1994). Langsam-wachsende Mykobakterien sind schwerkultivierbar und einige Arten dieser Gruppe gehören zu den obligat pathogenen Krankheitserregern. Die wichtigsten Arten dieser Gruppe sind *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *M. marinum* und *M. avium*. Durch Robert Koch wurde 1882 *M. tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose identifiziert. Mit diesem Erreger sind nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation ein Drittel aller Menschen infiziert. Die Zahl der Todesfälle wurde 1997, die durch Tuberkulose verursacht wurden mit 2 Millionen angegeben (Dye et al., 1999). So kommen mehr Menschen durch Tuberkulose zu Tode, als durch irgendeinen anderen Krankheitserreger (Bloom & Murray, 1992). *M. bovis* ist der Erreger der Rindertuberkulose, der auch für den Menschen pathogen ist. *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ist der Erreger der Paratuberkulose (*Johne's disease*), der häufigsten bakteriellen Erkrankung von Rindern (Cocito et al., 1994). Alleine für die Vereinigten Staaten von Amerika soll der jährliche landwirtschaftliche Schaden 1,5 Milliarden US Dollar betragen (Jones, 1989). *M. avium* und *M. intracellulare* sind die häufigste Todesursache von AIDS Patienten (20-50% für *M. avium*) (Brettle, 1997).

Die meisten Arten der schnellwachsenden Mykobakterien sind für den Menschen apathogene Bodenbakterien (Collins, 1989). Zu ihnen zählen u.a. *M. gordonae*, *M. terrae* und *M. smegmatis*. Einige Erreger der schnellwachsenden Mykobakterien wie z.B. *M. fortuitum* und *M. chelonae* können jedoch schwere Infektionen verursachen (Clapper & Whitcomb, 1967; Safranek et al., 1987; Smith et al., 2001)

Verschiedene Mykobakterienarten wie *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* (Talaat et al., 1997) und *M. smegmatis* (Talaat et al., 1999) sind als Krankheitserreger bei Fischen beschrieben. *M. smegmatis* bildet in Goldfischen, *Carassius auratus*, Granulome, die mit denen von *M. tuberculosis* im Menschen histologisch vergleichbar sind (Talaat et al., 1999).

*M. smegmatis* gilt für viele molekularbiologische Untersuchungen als ein geeigneter Modellorganismus (Reyrat & Kahn, 2001). Gegenüber *M. tuberculosis* hat *M. smegmatis* den Vor-

teil, dass ein Labor der Sicherheitsstufe 2 für die meisten Untersuchungen ausreichend ist, dass die Wachstumsrate von *M. smegmatis* wesentlich über der von pathogenen Mykobakterien liegt und dass die Transformationsrate des *M. smegmatis*-Stamms mc<sup>2</sup>155 höher ist als von anderen *Mycobacterium*-Stämmen (Snapper et al., 1990).

Von den vielen Aspekten der Pathogenese von Mykobakterien soll hier ausschließlich auf die Bildung des mykobakteriellen Phagosoms eingegangen werden.

## 1.2 Phagozytose von Mykobakterien durch Makrophagen

Makrophagen sind Teil der angeborenen Immunantwort. Sie nehmen durch Phagozytose Zellteile oder ganze pro- und eukaryotische Zellen auf. Bei der Phagozytose unterscheiden Makrophagen zwischen körpereigenen Zellen bzw. Zellteilen und fremden Zellen. Bakterien werden in der Regel über Rezeptoren aufgenommen. Zu diesen gehören der Komplementrezeptor, der dem Integrin  $\alpha M\beta 2$  bzw. CD11b entspricht (Carroll, 1998; Chimini & Chavrier, 2000; Sengelov, 1995), der Fc- (Daeron, 1997) und der Mannoserezeptor (Stahl & Ezekowitz, 1998). Die Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor führt zur Polymerisation von Aktin an der Stelle, an der das Bakterium aufgenommen wird (Aderem & Underhill, 1999). Während sich bei Fc-Rezeptor-vermittelter Phagozytose Pseudopodien bilden, wird bei Komplementrezeptor-vermittelter Phagozytose das Bakterium in den Makrophagen hineingezogen (Kaplan, 1977). Antikörper stellen eine Schnittstelle zwischen der erworbenen und der angeborenen Immunantwort dar (Aderem & Underhill, 1999). Sie erkennen mit sehr hoher Spezifität Antigene auf Bakterienzellen. Der Fc-Teil des Antikörpers wird von einem Rezeptor der Fc-Rezeptor-Familie gebunden (Ravetch, 1997; Ravetch & Clynes, 1998; Unkeless et al., 1995). Die Fc $\gamma$ -Rezeptor vermittelte Phagozytose ist am besten verstanden. Der humane Fc $\gamma$  RIIA-Rezeptor beispielsweise besteht aus einer extrazellulären Domäne, die den Fc-Teil von Antikörpern bindet, einem Transmembranbereich und einem zytoplasmatischen Teil mit zwei YXXL ITAM-Motiven (ITAM: immunoglobulin gene family tyrosine activation motif) (Ravetch, 1994; Reth, 1989). Das Binden eines Liganden an diesen Rezeptor führt zu einem Zusammenlagern der Rezeptormoleküle und zur Phosphorylierung des ITAM-Motivs. Für diesen Vorgang und die Aktivierung von PI3-Kinase ist die SYK-Kinase notwendig (Cox et al., 1996). Für die Polymerisation von Aktin sind GTPasen der Rho-Familie verantwortlich (Hackam et al., 1997).

*M. tuberculosis* wird über den Komplement-Rezeptor (Cywes et al., 1996; Cywes et al., 1997; Schlesinger et al., 1990; Schlesinger et al., 1994) und den Mannose-Rezeptor (Astarie-Dequeker et al., 1999; Schlesinger, 1993) aufgenommen. Opsonisierte *M. tuberculosis*-Zellen können auch über den Fc-Rezeptor phagozytiert werden (Malik et al., 2000). Diese Form der Aufnahme stellt für *M. tuberculosis* einen Nachteil im intrazellulären Überleben dar (Malik et al., 2000).

### 1.3 Das Phagosom von *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. avium* in humanen und murinen Makrophagen

Als wichtigste Virulenz-Eigenschaft von pathogenen Mykobakterien (außer *M. ulcerans*) wird die Fähigkeit gesehen, in Makrophagen zu überleben und intrazellulär zu proliferieren (Deretic & Fratti, 1999). Armstrong & Hart (1975) konnten als erste zeigen, dass das Phagosom von *M. tuberculosis* nicht mit Lysosomen fusioniert. Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion eine Folge des Ausbleibens der phagosomalen Reifung ist (Clemens & Horwitz, 1995; Hasan et al., 1997; Via et al., 1997; Xu et al., 1994). Die Phagosomen von toten Mykobakterien oder zusammenhängende Bakterien fusionieren mit Lysosomen (Clemens & Horwitz, 1995).

Für die Inhibierung der Phagosomen-Reifung wurden verschiedene Mechanismen postuliert (Clemens, 1996). So wurde das Ausbleiben der phagosomalen Reifung auf die Produktion von Ammonium zurückgeführt (Gordon et al., 1980). *M. tuberculosis* produziert Ammonium vor allem über die Aktivität der Urease (Clemens et al., 1995). Durch den Vergleich mit der Urease aus *M. smegmatis* schließt Clemens (1996), dass die Ammoniumproduktion möglicherweise zur Virulenz von *M. tuberculosis* beiträgt, aber nicht als einziger Faktor angesehen werden kann. Insbesondere die Eigenschaften der mykobakteriellen Zellwand sollen für die Inhibierung der Fusion zwischen Phagosomen und Lysosomen verantwortlich sein (Crowe et al., 1994; Goren et al., 1976; Ryter et al., 1984; Spargo et al., 1991).

Verschiedene Proteine des Makrophagen wurden in Verbindung mit der Inhibierung der phagosomalen Reifung gebracht. Eines der Makrophagen-Proteine ist das TACO-Protein (Ferrari et al., 1999; Pieters, 2001). TACO findet sich assoziiert mit Phagosomen von lebenden pathogenen Mykobakterien, aber nicht von toten Mykobakterien. In Zellen, die kein TACO exprimieren, werden pathogene Mykobakterien verdaut. TACO ist zu 35% identisch mit Coronin aus *Dictyostelium discoideum* (Ferrari et al., 1999). Der kausale Zusammenhang zwischen der

phagosomalen Reifung und dem Verbleiben von TACO am Phagosom wird von neueren Untersuchungen in Frage gestellt (Schuller et al., 2001).

Die Fusion von frühen Endosomen mit Phagosomen und Phagosomen mit Lysosomen wird über kleine GTPasen, den sog. Rab-Proteinen, gesteuert (Pfeffer, 1994). Die Fusionsrate von frühen Endosomen untereinander und mit Phagosomen wird über Rab5 reguliert (Desjardins et al., 1994; Rybin et al., 1996). Rab7 ist mit späten Endosomen assoziiert (Chavrier et al., 1990) und bewirkt die Reifung von Phagosomen (Feng et al., 1995; Rupper et al., 2001). Während Rab5 in Phagosomen von pathogenen Mykobakterien vorhanden ist, fehlt Rab7 in diesen Phagosomen (Fratti et al., 2000; Via et al., 1997). Es ist aber umstritten, ob Rab7 eine kausale Rolle bei der Inhibierung der phagosomalen Reifung spielt (Clemens et al., 2000).

Ein detailliertes Modell des Phagosoms von pathogenen Mykobakterien ist im Diskussionsteil dieser Arbeit wiedergegeben (Abb. 59, S. 97).

### 1.3.1 Phagosomaler pH

Die Ansäuerung des Phagosoms muss als ein entscheidender Schritt in der Abtötung von Mikroorganismen im Phagosom angesehen werden (de Chastellier & Thilo, 1999). Die pH-Verminderung selbst ist nur für vergleichsweise wenige Mikroorganismen tödlich (Haas & Goebel, 1992). Entscheidender ist vielmehr die Aktivität von Hydrolasen, deren pH-Optimum zwischen pH 4 und 5 liegt. Des Weiteren wird durch die Absenkung des pH-Wertes der oxidative Stress erhöht, da die spontane Dismutation von  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  eine maximale Rate bei pH 4,8 hat (Fridovich, 1978). Durch die Aktivität der NADPH-Oxidase, die sich in der phagosomalen Membran anreichert, werden toxische Sauerstoff-Derivate gebildet, die neben den Hydrolasen zum Abtöten der Mikroorganismen beitragen (Leusen et al., 1996).

Bei verschiedenen pathogenen Mikroorganismen kommt es nur zu einer geringen Ansäuerung des Phagosoms auf einen pH-Wert von 6,1, z.B. bei *Legionella pneumophila* (Horwitz & Maxfield, 1984), *Toxoplasma gondii* (Sibley et al., 1986) und *M. tuberculosis*, *M. avium* und *M. bovis* BCG (Crowle et al., 1991; Hackam et al., 1998; Oh & Straubinger, 1996).

Bei pathogenen Mykobakterien wird diese geringe Ansäuerung auf die geringe Menge an V-ATPase, die in der phagosomalen Membran lokalisiert ist, zurückgeführt (Hackam et al., 1997).  $Na^+/H^+$ -austauschende Proteine sind zwar in der phagosomalen Membran vorhanden, sollen aber für den phagosomalen pH-Wert eine untergeordnete Rolle spielen (Hackam et al., 1997). Ein weiterer wichtiger Hinweis, dass der phagosomale pH-Wert von großer Bedeutung für das Überleben von Mykobakterien im Phagosom ist, zeigt sich in der Tatsache, dass ein

Locus auf dem Chromosom 1 der Maus, der mit *bcg* bezeichnet wird, für eine natürliche Resistenz gegen verschiedene pathogene Mykobakterien verantwortlich ist (Appelberg & Sarmiento, 1990; Gros et al., 1981; Malo & Skamene, 1994). Diese natürliche Resistenz beruht auf der Aktivität von Nramp1 (*natural resistance-associated macrophage protein*), welches eine Ansäuerung des Mykobakterien-Phagosoms bewirkt (Hackam et al., 1998).

## 1.4 Differenzielle Genexpression

Um den Mechanismus zu verstehen, mit dem ein pathogenes Bakterium das Immunsystem umgeht, müssen die bakteriellen Gene identifiziert werden, die für jeden einzelnen Schritt der Infektion notwendig sind (Mahan et al., 1993). Die Expression der meisten bekannten Virulenz-Faktoren wird durch Mikromilieufaktoren induziert, die mit Mikromilieufaktoren im Wirtsgewebe übereinstimmen (Mekalanos, 1992). Die Identifizierung von zusammenhängenden DNA-Abschnitten, die Gene kodieren, welche für die Virulenz von Bedeutung sind, sog. Pathogenitätsinseln (PAIS), stellt einen großen Fortschritt im Verständnis der Virulenz dar (Hacker et al., 1997; Lee, 1996). Pathogenitätsinseln wurden beispielsweise bei *Helicobacter pylori* (Figura & Valassina, 1999), *Yersinia*-Arten (Schubert et al., 1998), *Salmonella*-Arten (Suarez & Russmann, 1998), *Pseudomonas syringae* (Collmer et al., 2000) und *Escherichia coli* (Kaper, 1998) identifiziert. Ein vergleichbarer genomischer Abschnitt, der *icm/dot* (*intracellular multiplication/defect in organelle trafficking*) (Berger & Isberg, 1993; Brand et al., 1994; Marra et al., 1992) genannt wird, wurde bei *Legionella pneumophila* gefunden und charakterisiert. Durch den Vergleich verschiedener Mykobakterien-Genome wurden genomische Abschnitte erfasst, die bei Stämmen mit verminderter Virulenz fehlen und in anderen Stämmen vorhanden sind (Mahairas et al., 1996; Tizard et al., 1998). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Virulenzverminderung und dem isolierten DNA-Abschnitt konnte bisher aber nicht gezeigt werden.

Von großem Interesse sind mykobakterielle Gene, die differentiell im Phagosom exprimiert werden. Zur Identifizierung dieser Gene wurden sehr unterschiedliche Methoden angewandt. Diese Methoden lassen sich in vier Gruppen unterteilen: Methoden, die Unterschiede im Genom erzeugen, Methoden, die mRNA-Transkripte vergleichen, Methoden, die zur Erfassung von Promotoraktivitäten dienen, und solche, die Unterschiede im Proteinmuster hervorheben. Zur ersten Gruppe gehört die Transposon-Mutagenese mit deren Hilfe Virulenz-assoziierte Gene in *M. tuberculosis* identifiziert wurden (Camacho et al., 1999). Durch Vergleiche von mRNA-Transkripten wurden Gene identifiziert, die bei pathogenen Mykobakterien diffe-

rentiell im Phagosom exprimiert werden (Graham & Clark-Curtiss, 1999; Li et al., 2001; Plum & Clark Curtiss, 1994). Zu den identifizierten Genen gehört das ‚*macrophage induced gene*‘ (*mig*) (Plum & Clark Curtiss, 1994) und der Sigma-Faktor E (Graham & Clark-Curtiss, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass *mig* eine Acyl-CoenzymeA-Synthetase kodiert (Morsczech et al., 2001).

Unter der Verwendung verschiedener Reporter-Gene war es möglich Gene zu identifizieren, die differentiell exprimiert werden. Zu diesen Reporter-Genen gehört die Luziferase, die von Marston & Shinnick (1996) benutzt wurde, und das grün fluoreszierende Protein (GFP). GFP wird bei der Zellsortierung mittels eines FACS-Gerätes verwendet (Valdivia & Falkow, 1996; Valdivia & Falkow, 1997). Diese Methode wird ‚*differential fluorescence induction*‘ (DFI) genannt. Sie wurde für *M. bovis* BCG und *M. marinum* angewandt (Barker et al., 1998; Ramakrishnan et al., 2000; Triccas et al., 1999).

Eine indirekte Methode zur Identifizierung von Virulenz-Faktoren ist die Suche nach homologen Genen von bekannten Virulenz-Faktoren. Dazu gehören Gene, die unter erhöhtem oxidativem Stress gebildet werden und Oxidantien abbauen können, wie z.B. das Katalase-Gen *katG* und die Superoxid-Dismutase *sod*. Das *invA*-Gen wurde auf Grund seiner Homologie zum *iap*, das beim Eindringen von *Listeria monocytogenes* in die eukaryotische Zelle eine Rolle spielt (Kuhn & Goebel, 1989), identifiziert (Labo et al., 1998). *invA* zeigt aber auch Homologie zur Integrase von *E. coli* (Poelarends et al., 2000). In Makrophagen wird *invA* differentiell exprimiert (Mariani et al., 2000). Die Suche nach homologen Genen führte auch zur Identifizierung von *tlyA*, das wegen seiner Homologie zum *tlyA* von *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* im mykobakteriellen Genom identifiziert und für das hämolytische Aktivität gezeigt wurde (Wren et al., 1998).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass verschiedene Gene identifiziert werden konnten, die mit der Virulenz der Mykobakterien in Verbindung stehen. Um die Pathogenese von Mykobakterien zu verstehen, müssen die einzelnen Schritte dieses Prozesses und die Rolle, die die entsprechenden Virulenz-Faktoren dabei spielen, besser charakterisiert werden.

## 1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungsweise der Virulenz-Faktoren *hly* und *tlyA* auf das Überleben von *M. smegmatis* in Makrophagen zu charakterisieren. Dabei sollte die Überlebensrate von *M. smegmatis*-Transformanten, die *hly* oder *tlyA* exprimieren, mit der Überlebensrate von Zellen, die dem Wildtyp entsprechen, verglichen werden. Es sollte ein

Zusammenhang zwischen der Überlebensrate und Prozessen im Makrophagen hergestellt werden. Hierfür sollte deutlich gemacht werden, ob die Bakterien von einer phagosomalen Membran umgeben sind oder die phagosomale Membran aufgelöst wird. Es sollte geprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem phagosomalen pH-Wert und der Expression von *tlyA* und *hly* gibt.

Promotoren, die durch das Mikromilieu des Phagosoms induziert sind, sollten aus dem mykobakteriellen Genom isoliert werden. Die Aktivität der isolierten Promotoren sollte extra- und intrazellulär gemessen werden und mit anderen mykobakteriellen Promotoren verglichen werden. Ein Zusammenhang zu Stressfaktoren sollte aufgezeigt werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Tab. 1: Liste der in dieser Arbeit benutzten Geräte.

<b>Elektrophoreseapparaturen</b>	Bio-Rad Mini-Protean Gelkammer IITM Pharmacia Gelkammern für Agarosegel-Elektrophorese
<b>Elektroporationsgerät</b>	Bio-Rad Gene Pulser BioRad coli-Pulser
<b>Feinwaage</b>	Sartorius 2004 MP
<b>Fluoreszenzphotometer</b>	Wallac Victor <sup>2</sup> TM Multilabel Counter 1420
<b>Inkubationsschüttler</b>	New Brunswick Scientific Innova 4230 New Brunswick Scientific G10 Gyrotory Shaker
<b>PCR-Geräte</b>	Perkin-Elmer-Cetus GeneAmp PCR-System 9600 MJ Research PTC100
<b>pH-Meter</b>	WTW Multilab S40
<b>Sequenzier-Geräte</b>	Applied Biosystems ABI Prism Model 310
<b>Spannungsgeber</b>	BioRad Powersupply 200/2.0 Pharmacia Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150 Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS 500/400
<b>Spektralphotometer</b>	Shimazu UV 1202
<b>Thermoblock</b>	Themomixer comfort Eppendorf
<b>Videodokumentationsanlage</b>	Bio Rad Geldoc 2000
<b>Zellmühle</b>	Retsch Zell-Mühle MM2000
<b>Zentrifugen</b>	Heraeus Sepatech Biofuge 13 Heraeus Sepatech primo Heraeus Biofuge pico Du Pont Instruments Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Rotoren: SS34, GS3)
<b>Transilluminator</b>	Flu-O-Blu Biozym

### 2.2 Chemikalien

Agar-agar (Baker, Darmstadt; Serva, Heidelberg), Agarose (Seakem; Biozym, Oldendorf), Ampicillin (Sigma-Aldrich, München), BactoTrypton (Difco, Augsburg), Desoxynukleosid-, Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (Perkin-Elmer, Foster City, USA; Boehringer, Mannheim), Ethanol (Riedel de Haen, Seelze), Ethylendiamin-N,N,N',N'Tetraessigsäure-Dinatriumsalz = EDTA (Merck, Darmstadt), Ethidiumbromid (Bio-Rad, München), Ficoll-Paque (Pharmacia), Gentamycin (Sigma-Aldrich, München), Glycerin (Riedel de Haen, Seelze), Hefe-Extrakt (Difco, Augsburg), Kanamycin (Sigma-Aldrich, München), „1kb ladder“ (MBI), Natriumchlorid (Riedel de Haen, Seelze), Protein Größenstandard „rainbow-ladder“ (Amer-

sham, Freiburg), Proteinase K (Sigma-Aldrich, München), Rinderserumalbumin BSA (Serva, Heidelberg), RPMI 1640 (Invitrogen, Karlsruhe), Streptomycin (Sigma-Aldrich, München), Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, München), Tween80 (Serva, Heidelberg), 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galaktopyranosid = x-gal (Boehringer),

Alle sonstigen Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Buchler (Braunschweig), Baker, Bio-Rad (München), Boehringer (, Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Seakem, Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

## 2.3 Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden Oligonukleotide zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR und zur Klonierung in Vektoren verwendet. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert und sind in Tab. 2 und Tab. 3 aufgeführt.

**Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung und Amplifizierung mittels PCR**

Name	Sequenz	Verwendung
fw Tly GF	GGGGTACCACTTCCGGGCGGCACTGGTGG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von <i>tlyA</i>
rw Tly A	GGTACCTGTGGACGACCAGCAGAACACTGCG	s. fw Tly GF
P sigE fw	CCATGTTCCGACGCTAGGCGACAG	Oligonukleotid zur Amplifizierung des <i>sigE</i> -Promotors mittels PCR
P sigE rv <i>Bam</i> HI	CGGGATCCCCAGGACGGCATGGCCGC	s. P <i>sigE</i> fw; mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle am 5'-Ende
P <i>rpsL</i> fw	TCACCGATATGCTGCTGCGC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung des <i>rpsL</i> -Promotors
P <i>rpsL</i> rv <i>Bam</i> HI	CGGGATCCCGACCACTGCTGAATGGT	s. P <i>rpsL</i> fw; mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle am 5'-Ende
PcysDfw	AAATACCCAGTTGGCGTAGCG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung des <i>cysD</i> -Promotors; mit halber <i>Swa</i> I-Schnittstelle
PcysDrv	CGGGATCCCTGTTCCACGTCCTCATA	s. PcysDfw; mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
ProTrapSense	GCGGATCCGCAAGCCCCACCAAGGC	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung der Insertionsstelle des Vektors pTRAP
ProTrapAntisense	TGTTGGAATTAAATCGCGGC	s. ProTrapSense
fw TlyRFP	GGCTGCAGACTTCCGGGCGGCACTGGTGG	PCR-Oligonukleotid zur Amplifizierung von Tly zur Fusion mit RFP; <i>Pst</i> I-Schnitt
rev Tly-RFP	GGTGGATCCACGGGCCCTCGCTAATCGCACGG	s. fw TlyRFP; <i>Bam</i> HI-Schnitt
M13	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung von pBluescript II (KS)

Name	Sequenz	Verwendung
M13 reverse	CTTTTGTTCCCTTAGTGAGGGTTAATT	Sequenzierung von pBluescript II (KS)
universe	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Sequenzierung von pBluescript II (KS)
reverse	TCATGGTCATAGCTGTTTC	Sequenzierung von pBluescript II (KS)

Tab. 3: Oligonukleotide zur Einführung synthetischer DNA-Verbindungsstücke (*Linker*)

Name	Sequenz	Verwendung
ProTrapGFP fw	CAAGCTTCGGGTCGACGGATCC GCCAGCTGATTAAATCTGCA	Verbindungsstück für Vektor pTRAP zur Deletion von <i>hly</i> , <i>rpsL</i> und <i>lacZ</i>
ProTrapGFP rv	GGATTAAATCAGCTGGCGGAT CCGTCGACCCGAAGCTTGGTAC	s. ProTrapGFP fw
LinkGTGfw	GATCCCAGCTGATTAAATTTAAT	Verbindungsstück für Klonierungsschnittstelle von pGFP3 zur Einführung von <i>PvuII</i> -Schnittstelle und Deletion einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle
LinkGTGrv	TAAATTTAAATCAGCTGG	s. LinkGTGfw
Term U20115 fw	GTAGGCCGGCCACGGCGATCA TCGCGGTCGCGCGGAGCTCTCG	Synthetische Sequenz des <i>rnhA</i> Terminators von <i>M. smegmatis</i>
Term U20115 rv	CGAGAGCTCCGCGCGACCGCG ATGATCGCCGTGGCCGGCCTAC	s. Term U20115 fw
TB-Term NaeI	GTAGGCCGGCTTGCATAGAGTTACGGCG	
LinkerNcoI->SwaI	CATGCATTTAAATG	Verbindungsstück zum Austausch einer <i>NcoI</i> -Schnittstelle gegen eine <i>SwaI</i> -Schnittstelle
Term sinR ff	AGAGGAGTAGTGCTGAGCAGAGG CACTAACTCCTCAGAGGAGTAGTG CCTGAGCAGAGGCACTAATCTCTCA TTTAAAT	Terminatorsequenz von <i>B. subtilis</i> des <i>sinR</i>
Term sinR rw	GATCCATTTAAATGAGGAGTTAGTGCCTCTG CTCAGGCACACTCTCTCTGAGGAGTTAGTGCC TCTGCTCAGGCACACTCTCTCT	s. Term <i>sinR</i> ff
T4 ff	GGTACCAAAACCTCCGCTTTATCGCGGAGGTT TTACAGAGACCCCTATCAATAGGGGTCTTT GTATTTAAATG	Zusammengesetzter Terminator aus Terminatorsequenz von <i>B. subtilis</i> Protoporphyrinogen IX oxidase und Terminatorsequenz von <i>M. smegmatis whib3</i>
T4 rw	GATCCATTTAAATACAAAGACCCCTATTTGA TAGGGGTCTCTGTAAACCTCCGCGATAAAGCG GAGGTTTGGTACC	s. T4 ff
Linker ff rT SD	GATCAGATCTCTGACAAAGGGGCACAGGCG	Verbindungsstück zur Einführung einer Ribosom-Bindungs-Sequenz vor <i>rpsL</i>
Linker rw rT SD	AGCTCGCCTGTGCCCTTTGTGAGAGATCT	s. Linker ff rT SD
Link EcoRI zu Kpn	AATTGGTACC	Verbindungsstück zum Austausch einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle gegen eine <i>KpnI</i> -Schnittstelle
Link ThisRfp fw	GATCTGTACACACCACCACCAC CACGATTGCGAG	Verbindungsstück zur Einführung eines His-Tags in Vektor pT-R in die <i>BamHI</i> -Schnittstelle
Link ThisRfp rv	GATCTGCGAATCGTGGTGGTGGTG GTGGTGTGACA	s. Link ThisRfp fw
Link ff Kpn->SwaBamPac	ATTTAAATCGGGATCCGCTTAATTAAGC	Verbindungsstück zur Einführung einer Klonierungsschnittstelle in den Vektor pTRAP2
Link rv Kpn->SwaBamPac	GCTTAATTAAGCGGATCCCGATTAAATGTAC	s. Link ff Kpn->SwaBamPac
Linker Kpni->SwaI	GATTTAAATCGTAC	Austausch der einer <i>KpnI</i> -Schnittstelle gegen eine <i>SwaI</i> -Schnittstelle

## 2.4 Plasmide

**Tab. 4: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet bzw. erstellt wurden**

Name	Merkmale	Beschreibung	Quelle
pBSL141	Amp <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	Vektor mit Gentamycin-Resistenz-Kassette	Alexeyev et al. (1995)
pBluescript II (KS)	Amp <sup>r</sup> ColE1	Klonierungs- und Expressionsvektor	Stratagene (Amsterdam, Niederlande); Short et al. (Short et al., 1988)
pFDY157	Amp <sup>r</sup> ColE1 <i>lacZ</i>	Plasmid mit promotorlosem <i>lacZ</i>	K. Schnetz
pDsRed1-1	RFP	Klonierungsplasmid mit RFP	Clontech, Heidelberg
pBlue <i>lacZ</i>	Amp <sup>r</sup> ColE1 <i>lacZ</i>	pBluescript II (SK) mit <i>lacZ</i> aus pFDY157	Diese Arbeit
pBlue: <i>rpsL</i>	Amp <sup>r</sup> ColE1 <i>rpsL</i>	pBluescript II (SK) mit <i>rpsL</i> aus pMV261- <i>rpsL</i> <sup>+</sup>	Diese Arbeit
pBlue: <i>rpsLSD</i>	Amp <sup>r</sup> ColE1 <i>rpsL</i>	pBrps <i>L</i> mit Shine-Dalgarno-Sequenz	Diese Arbeit
pAT261	Kana <sup>r</sup> ColE1 pAL5000 <i>hly</i>	Identisch mit dem Plasmid pAT261, hier durch Deletion von <i>hly</i> des Plasmids pAT261: <i>hly</i> hergestellt	Gentshev et al. (1995) Stover et al. (1993)
pAT261: <i>hly</i>	Kana <sup>r</sup> ColE1 pAL5000 <i>hly</i>	Plasimdäres <i>E. coli</i> / Mykobakterien-Schaukelplasmid mit sezerniertem Listeriolysin	Hess et al. (1998)
pAT261: <i>tlyA</i>	Kana <sup>r</sup> ColE1 pAL5000 <i>tly</i>	pAT261 mit <i>tlyA</i> über PCR	Diese Arbeit
pAT261: <i>lacZ</i>	Kana <sup>r</sup> ColE1 pAL5000 <i>lacZ</i>	pAT261: <i>hly</i> mit <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
pMV261- <i>rpsL</i> <sup>+</sup>	Kana <sup>r</sup> ColE1 attP <i>rpsL</i> <sup>+</sup>	Integratives <i>E. coli</i> / Mykobakterien-Schaukelplasmid	Sander et al. (1995)
pGPC41	Amp <sup>r</sup> ColE1	GFP mut 3 Expressionsvektor	G. Plum
pGPC25GFP	Kana <sup>r</sup> ColE1 attP GFP	pMV261- <i>rpsL</i> <sup>+</sup> mit GFP	Diese Arbeit
pGPC25G	Gm <sup>r</sup> ColE1 attP <i>rpsL</i> <sup>+</sup>	pMV261- <i>rpsL</i> <sup>+</sup> mit Gentamycin-Resistenz-Kassette	Diese Arbeit
pUTkm1	<i>luxAB</i>	Plamid mit Minitransposon <i>luxAB</i>	de Lorenzo et al. (1990)
pGPC25g: <i>luxAB</i>	Gm <sup>r</sup> ColE1 attP	pGPC25g mit <i>luxAB</i>	Diese Arbeit
pTRAP1	<i>hly</i>	pAT261: <i>hly</i> mit Verbindungsstück, Linker/ <i>NcoI</i> - <i>SwaI</i>	Diese Arbeit
pTRAP2	<i>lacZ</i>	pAT261: <i>hlySwaI</i> mit <i>lacZ</i> aus Blue <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
pTRAP3	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP1 mit <i>rpsL</i> aus pBrps <i>LSD</i>	Diese Arbeit
pTRAP4	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP2 ohne HSP60-Promotor und mit Klonierungsschnittstelle	Diese Arbeit
pTRAP5	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP3 mit <i>rnhA</i> Terminators aus <i>M. smegmatis</i>	Diese Arbeit
pTRAP6	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP4 mit Terminatorsequenz des <i>sinR</i> aus <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit
pTRAP7	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP5 mit Terminator aus <i>B. subtilis</i> Protoporphyrinogen IX oxidase und Terminatorsequenz von <i>M. smegmatis whib3</i>	Diese Arbeit
pTRAP8	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP6 mit Verbindungsstück Austausch von <i>EcoRI</i> - gegen <i>KpnI</i> -Schnittstelle	Diese Arbeit
pTRAP	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP6 mit <i>KpnI</i> -Fragment in umgekehrter Orientierung	Diese Arbeit

Name	Merkmale	Beschreibung	Quelle
pTRAP:P <sub>HSP60</sub>	P <sub>HSP60</sub>	pTRAP mit HSP60-Promotor aus pAT261: <i>hly</i>	Diese Arbeit
pTRAP:Klon4	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP mit Fragment des Klon 4	Diese Arbeit
pTRAP:Klon21	<i>hly rpsL lacZ</i>	pTRAP mit Fragment des Klon 21	Diese Arbeit
pPGFP1		pTRAP mit synthetischer DNA	Diese Arbeit
pPGFP2		pPGFP1 mit Terminatorenkassette aus pTRAP	Diese Arbeit
pPGFP3	GFP	pPGFP2 mit GFP aus pGPC41	Diese Arbeit
pPGFP	GFP	pPGFP3 mit Verbindungsstück zur Deletion einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	Diese Arbeit
pPGFP:P <sub>ahpC</sub>	GFP P <sub>ahpC</sub>	pPGFP mit ahpC-Promotor aus pTRAP:Klon4	Diese Arbeit
pPGFP:P <sub>HSP60</sub>	GFP P <sub>HSP60</sub>	pPGFP mit HSP60-Promotor aus pAT: <i>hlySwal</i>	Diese Arbeit
pPGFP:P <sub>rpsL</sub>	GFP P <sub>rpsL</sub>	pPGFP mit rpsL-Promotor mittels PCR	Diese Arbeit
pPGFP:P <sub>sigE</sub>	GFP P <sub>sigE</sub>	pPGFP mit <i>sigE</i> -Promotor mittels PCR	Diese Arbeit
pAT261:RFP	RFP	pAT261 mit RFP aus pDsRed1-1	Diese Arbeit
pGPC25G:RFP	RFP Gm <sup>r</sup>	pGPC25G mit RFP aus pDsRed1-1	Diese Arbeit

## 2.5 Amplifikation von DNA mittels PCR

DNA-Fragmente, die für die Klonierung vorgesehen waren, wurden mit der DNA-Polymerase PFU (Promega, Mannheim) und DNA-Fragmente, die dem spezifischen Nachweis dienen, mit Taq-Polymerase amplifiziert.

Zur PCR-Amplifikation wurden 1–10 ng DNA, 5 µM Primer (0,5 µM), 20 nM dNTPs (20 µM), 15 mM MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 5 U/µl Polymerase (0,5–1U) und 10x PCR-Puffer nach Herstellerangaben in einem Volumen von 25 oder 50 µl eingesetzt. Nach 1 min Denaturierung bei 94°C wurden 28 bis 39 Zyklen von 20 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Hybridisierung bei 45–68°C und 30 s bis 4 min Verlängerung bei 72°C durchlaufen. Anschließend wurde die Verlängerung 10 min bei 72°C fortgesetzt und danach wurden die Ansätze auf 4°C gekühlt. 10 µl des PCR-Reaktionsansatzes wurde in einem 0,8-2%igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

## 2.6 Bakterienstämme und Zelllinien

**Tab. 5:** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Charakterisierung	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> ( $\Phi$ 80d $\Delta$ lacZM15) $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR	Life Technologies (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	elektroporationskompetenter <i>M. smegmatis</i> -Stamm	Snapper et al. (1990)
<i>M. smegmatis</i> S1000	Streptomycin resistenter Stamm von <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Diese Arbeit

**Tab. 6:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung	Quelle
THP-1	humane Leukämie-Zelllinie, phagozytierend, Expression Fc- und C3b-Rezeptoren	Tsuchiya et al. (1980)
RAW 264.7	murine Leukämie-Zelllinie aus BALB/c, phagozytierend, keine Expression Nramp-1	Ralph et al. (1977), Raschke et al. (1978)

## 2.7 Klonierungsmethoden

### 2.7.1 Aufreinigung von DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAGEN Genomic-tip System (Qiagen, Hilden) isoliert. Für die Plasmid-Reinigung auf *E. coli* wurde das ‚QIAprep Spin Miniprep‘-Verfahren angewendet. Die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde mittels des ‚Gel Extraction Kits‘ von Qiagen (Hilden) vorgenommen.

### 2.7.2 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

Für die Sequenzierungsreaktion wurde das ‚Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit‘ (Perkin Elmer, Beaconsfield, England), unterschiedliche Oligonukleotide und gereinigte Plasmid-DNA und PCR-Produkte verwendet. Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden mit dem ‚DyeEx Spin Kit‘ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

### 2.7.3 Enzyme

Alle Endonukleasen wurden von New England Biolabs (NEB, Frankfurt) nach der Beschreibung des Herstellers benutzt. Des weiteren wurden T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe),

T4-DNA-Polymerase (NEB), *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden), *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) und alkalische Phosphatase (Roche, Basel, Schweiz) verwendet.

#### 2.7.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Aliquots einer Stockkultur wurden auf eine LB-Platte so aufgetragen, dass nach ca. 16 h Inkubation bei 37°C einzelne Kolonien erkennbar wurden. Eine Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in LB-Medium für mindestens 18 h bei 37°C geschüttelt. 1 ml dieser Übernachtskultur wurden in 100 ml warmen LB-Medium gegeben. Diese Kultur wurde für 90 bis 120 min bei starkem Schütteln und 37°C bis zu einer OD zwischen 0,4 und 0,6 inkubiert und danach in zwei 50 ml-Gefäßen bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 25 ml eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen. Nach vorsichtigem Resuspendieren wurden die Bakterienzellen für mindestens 1 h auf Eis gelassen. Danach wurden die Zellen erneut bei 4°C zentrifugiert und in 2,5 ml eiskaltem TMF-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in 150 µl Aliquots aufgeteilt und bei -75°C eingefroren.

Aliquots von *E. coli*-Zellen in TMF wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz für mindestens 1 h inkubiert. Danach wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad für 90 sec geschockt. Der gesamte 160 µl Ansatz wurde daraufhin in 1 ml warmem LB-Medium aufgenommen und für eine angemessene Dauer, die sich nach dem verwendeten Antibiotikum richtete, bei 37°C geschüttelt. Die Dauer der Expression waren für Ampicillin 35 min, für Kanamycin 45 min und für Gentamycin 1 h. Der Transformationsansatz wurde dann für 1 min zentrifugiert und das verbleibende Bakterienpellet auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum gebracht.

#### 2.7.5 Transformation kompetenter *M. smegmatis*-Zellen

Die Herstellung elektrokompenter *M. smegmatis*-Zellen richtete sich nach dem Protokoll von Dellagostin et al. (1993). 1 ml von *M. smegmatis*-Kulturen einer berechneten optischen Dichte von 1 wurden in 200 ml warmem LB-Medium gegeben und für 2 Tage bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und dann bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem 10%igem Glyzerin mit 0,2 % Tween80 aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mindestens 5 mal wiederholt. Anschließend wurden das Bakterienpellet 1:1 in 10%igem Glyzerin mit 0,2 % Tween80 gelöst und in 50 µl Aliquots bei -75 °C eingefroren.

Ein Aliquot wurde auf Eis aufgetaut und in eine eiskalte 0,2 mm Elektroporationsküvette gegeben. Zu den Zellen wurde eine entsprechende Menge DNA gegeben. Die Elektroporation wurde mit einem ‚BioRad Gene Pulser‘ oder einem ‚BioRad coli-Pulser‘ bei 200  $\Omega$ , 2,5 kV und 25  $\mu$ F durchgeführt. Die Zellen wurden daraufhin in warmem LB-Medium aufgenommen und für 3 h bei 37°C und schütteln inkubiert. Anschließend wurde ein Teil des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

## 2.8 Kulturmedien

In Tab. 7 sind die Medien, die für Bakterienkulturen benutzt wurden, aufgelistet.

**Tab. 7: Verwendete Kulturmedien.**

<b>LB Medium</b>	1,5 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,2
<b>Terrific Broth</b>	Trypton 12 g/l, Yeast Extract 24 g/l, Glycerin 4 ml/l, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,31 g/l, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 12,54 g/l
<b>Middlebrook-Medium</b>	0,25 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 % (w/v) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 % (w/v) Na-Glutamat, 0,05 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01 % (w/v) Na-Citrat, 0,005 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,004 % (w/v) Eisen Ammonium-Citrat, 0,0001 % (w/v) $\text{CuSO}_4$ , 0,0001 % (w/v) Pyridoxine, 0,0001 % (w/v) $\text{ZnSO}_4$ , 0,00005 % (w/v) Biotin, 0,00005 % (w/v) $\text{CaCl}_2$ , 0,2 % (v/v) Tween80 und 100 ml ADC
<b>TMF</b>	100mM $\text{CaCl}_2$ , 50 mM RbCl, 40 mM $\text{MnCl}_2$ , 10% Glycerin

## 2.9 Antibiotika

Für die Selektion auf Vektor-tragende Bakterien wurden folgende Antibiotika-Zusätze in den Nährmedien verwendet.

**Tab. 8: Konzentration der Antibiotika, die in dieser Arbeit verwendet wurden.**

	<b>E. coli</b>	<b>M. smegmatis</b>
Ampicillin	50-100 $\mu$ g/ml	-
Kanamycin	50 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml
Gentamycin	5-10 $\mu$ g/ml	5-10 $\mu$ g/ml

## 2.10 Herstellung von HMDM-Kulturen (human monocyte-derived macrophages)



Die Isolierung von Monozyten wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern in Anlehnung an die Protokolle von Crowle et al. (1986) und Meyer et al. (1998) durchgeführt. Dafür wurde Blut über einen Ficoll-Paque-Gradienten (Pharmacia, Uppsala) zentrifugiert. Die in der Interphase gesammelten mononukleären Zellen wurden wiederholt in 37 °C warmem RPMI 1640, das mit 10 %igem (v/v) autologem Serum oder FCS supplementiert war, gewaschen und anschließend resuspendiert (Invitrogen, Karsruhe). Es wurden  $10^6$  Zellen in eine Kammer von Glasboden-Platten gegeben (Nunc, Wiesbaden, Germany) und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nicht-adhärente Zellen wurden mit 37 °C warmen RPMI 1640 abgewaschen und die zurückbleibenden Monozyten (circa.  $5 \times 10^4$  Zellen/Kammer) wurden in Makrophagen-Medium bis zur Infektion kultiviert.

## 2.11 Infektion von Makrophagen

Die Infektion erfolgte mit kleinen Änderungen der Methode von Post et al. (2001). Makrophagen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  in einer Kammer gehalten. Das Volumen der Kultur lag dabei zwischen 2 und 3 ml. Als Kammern wurden entweder ‚6 well tissue culture plate‘ (Greiner, Frickenhausen) oder Objektträger mit einer aufgeklebten Flasche (Nunc, Roskilde, Dänemark) verwendet.

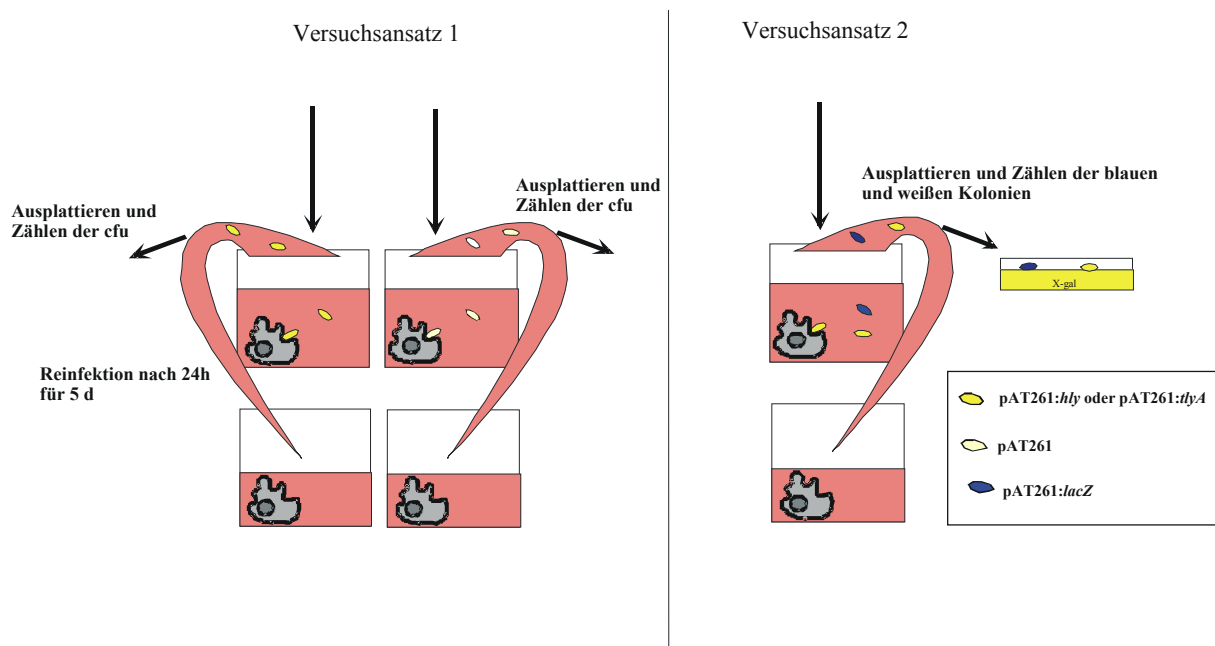
Die Anzahl der Bakterien wurde im Fall der Versuche zur Überlebensrate und für das Screening der genomischen DNA-Bank als koloniebildende Einheiten bestimmt. Dafür wurden Aliquots in 10er Verdünnungsschritten eingefroren, zwei Aliquots aufgetaut und die Anzahl der lebensfähigen Bakterien auf LB-Agarplatten in Verdünnungsreihen bestimmt.

Diese Methode hat sich für die Infektion von Makrophagenkulturen, die für die Untersuchung mit dem Elektronen- oder Fluoreszenz- oder Lasermikroskop vorgesehen waren, als unbrauchbar herausgestellt, da beim Einfrieren ein sehr unterschiedlicher Prozentsatz an Bakterien abstarb. Tote Bakterien oder wenig vitale Bakterien sind aber im EM und im Fluoreszenzmikroskop von lebenden Bakterienzellen oft schwer oder gar nicht zu unterscheiden. Eine Ausnahme machen GFP oder RFP-exprimierende Zellen. Hier lassen sich tote von vitalen Zellen gut unterscheiden, da mit dem Absterben die Fluoreszenz zurückgeht.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Bakterien nicht vorher eingefroren. Es wurde mit einer Bakterienkultur, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befand, mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 mit 500 µl in RPMI-Medium infiziert. Für ein genaueres Abschätzen der Infektionsrate wurden 5 µl Bakterienkultur im Phasenkontrast im Mikroskop betrachtet und die Anzahl der Bakterien geschätzt oder nach Sichtfeldern gezählt.

## 2.12 Überlebensraten

Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt, um die Überlebensrate von *M. smegmatis* in Makrophagenkulturen zu quantifizieren (Abb. 1). Zum einen wurden die Klone in getrennten Ansätzen infiziert und die Überlebensrate getrennt voneinander bestimmt. Zum anderen wurden die Klone in einem Ansatz infiziert und die Überlebensrate auf einer Platte bestimmt. Dieser Ansatz diente dafür, möglichst gleiche Versuchbedingungen für beide Klone zu erreichen. Der zweite Versuchsansatz entspricht im wesentlichen dem Ansatz von Miller & Shinnick (2000). Im Gegensatz zu dem von den Autoren verwendeten Ansatz wurde aber als Negativkontrolle nicht *M. smegmatis*-Zellen verwendet, die das Reporter-Gen *xylE* exprimieren, sondern das Reporter-Gen *lacZ*. Dafür wurden *M. smegmatis*-Zellen mit dem Vektor pAT261:*hly* und dem Vektor pAT261 bzw. pAT261:*lacZ* transformiert. Transformanten mit und ohne *hly*-Expression wurden parallel in zwei Makrophagenkulturen gebracht und jeweils nach 24 h die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) ermittelt (Abb. 1).



**Abb. 1:** Experimenteller Ablauf der Versuche zur Überlebensrate von *M. smegmatis* mit und ohne *hly*-Expression.

Die Überlebensrate der Makrophagen wurde in Prozent der vorhandenen THP-I-Zellen vor und 24 h nach der Infektion erfasst.

## 2.13 Laser- und Fluoreszenzmikroskopie

Für die Lasermikroskopie wurde ein TCS-NT *confocal laser scanning microscope* (Leica, Wetzlar) mit einem Argonlaser verwendet (der Kryptonlaser wurde nicht angewendet). Die Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden an einem Axioskop 2 mit Axio-CamHRc Kamera (Zeiss, Jena) durchgeführt.

### 2.13.1 Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen

Die Oberflächenproteine der Bakterienzellen wurden mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (Sigma-Aldrich, München) oder Fluoresceinisothiocyanat (Sigma-Aldrich, München) markiert. Die Zellen wurden dafür in 200 µl 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 9 mit 1 mg/ml Fluoresceinisothiocyanat und/oder 0,1 mg/ml Tetramethylrhodaminisothiocyanat aufgenommen.

Die Markierung mit Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) und Carboxyrhodamin-Succinimidylester (CRSE) (Molecular Probes, Leiden) wurde in Anlehnung an das Protokoll Porte et al. (1999) durchgeführt. Bei der Färbung wurden die Zellen in 200 µl 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5 resuspendiert und mit 100 µg/ml CFSE und CRSE für 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Bakterien 3 mal in PBS mit 0,5% Tween80 gewaschen und 1 mal PBS ohne Tween80. Vor der Infektion wurden die Bakterien in PBS aufgenommen.

### 2.13.2 Antikörperfärbung

Tab. 9: Liste der verwendeten Lösungen zur Antikörperfärbung

<b>Waschpuffer</b>	PBS, 0,1% Sarponin
<b>Blockierungspuffer</b>	PBS, 0,1% Sarponin, 5% FCS

Die Proben wurden mit 3%iger Paraformaldehyd PBS für 15 min fixiert. Danach 3 mal mit PBS gewaschen. Um die Membran permeabel zu machen, wurden die Proben mit Waschpuffer für 15 min inkubiert. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurden die Proben für 15 min mit Blockierungspuffer behandelt. Der Erstantikörper wurde 1:500 in Blockierungspuffer verdünnt und dann 30 min mit den Proben stehen gelassen. Die Proben

wurden 3 mal gewaschen und für 30 min mit dem 1:1000 verdünnten Zweitantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben in Mowiol eingebettet. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 10 aufgeführt.

**Tab. 10: Liste der verwendeten Antikörper**

<b>Name</b>	<b>Antigen</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Quelle</b>
Tetra-His™ Antibody	6 Histidine	Maus, monoklonal	Qiagen (Hilden)
Cy3™-conjugated Goat Anti-Rat	Mausantikörper	Ziege, monoklonal	Bionova
Rat Anti-Mouse CD107a Monoclonal Antibody	Maus Lamp-I	Ratte, monoklonal	Pharmingen (Heidelberg)
FITC-conjugated Rat Anti-Mouse CD71 Monoclonal Antibody	Maus Transferrin-Rezeptor (CD71)	Ratte, monoklonal	Pharmingen (Heidelberg)
Goat Anti-Mouse IgG HRP Blotting Congugat	Mausantikörper	Ziege, monoklonal	Biorad (München)

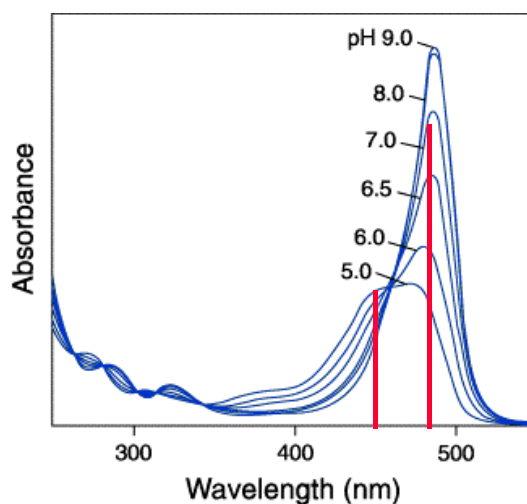
## 2.14 Messung des phagosomalen pH-Wertes

Zur Erfassung des phagosomalen pH-Wertes wurden vier unterschiedliche Verfahren gewählt, die in Tab. 11 aufgelistet sind.

**Tab. 11: Verwendete Methoden zur Bestimmung des phagosomalen pH-Wertes.**

Name	pH-Abhängigkeit	Anregungs- wellenlänge	Emissions- wellenlänge	Verwendetes Messgerät
Lysotracker (Molecular Probes)	Kolokalisation von Fluoreszenzfarbstoff in sauren Komparti- menten	470 nm	510-530 nm	Zeiss Axioskop 2 mit AxioCamHRc Kamera
FITC- Isothiocyanat, TRITC- Isothiocyanat	Abnahme der Fluo- reszenzstärke von FITC und Verschie- bung des Anregungs- spektrums (Abb. 2)	FITC: 450 nm und 485 nm  TIRIC: 560 nm	FITC: 535 nm  TRITC: 572 nm	Victor <sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter
CFSE	Verschiebung des Anregungsspektrums (Abb. 2)	450 nm und 485 nm	535 nm	Victor <sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter
CFSE, CRSE	Abnahme der Fluo- reszenzstärke von Carboxyfluorescein	Carboxyfluorescein: 470 nm  Carboxyrhodamin: 546 nm	Carboxyfluorescein: 510-530 nm  Carboxyrhodamin: 590 nm (long pass)	Zeiss Axioskop 2 mit AxioCamHRc Kamera

Fluorescein und Carboxyfluorescein sind Fluoreszenzfarbstoffe, die bei neutralem pH eine stärkere Fluoreszenz aufweisen als bei saurem pH. Gleichzeitig ändert sich das Anregungswellenlängenspektrum wie in Abb. 2 dargestellt.

**Abb. 2: Absorptionskurve von Fluorescein in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Wellenlängen, bei denen gemessen wurde, sind eingetragen (entnommen der Produktinformation von Molecular Probes, Leiden).**

Diese Eigenschaften wurden ausgenutzt um den phagosomalen pH-Wert zu bestimmen. Dabei wurden die Zellmembran- und Zellwandproteine der Bakterien entweder mit Fluoresceiniso-thiocyanat und Rhodaminisothiocyanat oder mit CFSE alleine oder zusammen mit CRSE ge-

färbt. Die Färbung der Bakterien ist unter 2.13.1 beschrieben. Rhodaminisothiocyanat bzw. CRSE sind pH unsensitiv. Die Fluoreszenzintensität wurde zum einem von der gesamten Zellkultur mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgerätes und zum anderen fluoreszenzmikroskopisch erfasst.

Lysotracker ist eine schwache Base, die sich in sauren Zellkompartimenten wie Lysosomen und Phagosomen anreichert. Entgegen der Empfehlung des Herstellers wurde Lysotracker 2 h vor der Infektion zu den RAW 264.7-Zellen gegen, da auf diese Weise eine stärkere Färbung saurer Kompartimente erzielt werden konnte. Diese Inkubationszeit entsprach der von Via et al. (1998) verwendeten.

## 2.15 Elektronenmikroskopie

Makrophagen wurden entweder in sog. 6 well-Platten oder auf Objektträgern mit aufgeklebter Flasche in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät wie unter 2.11 beschrieben. Die Kulturen wurden mit Bakterien im Verhältnis zwischen 10 und 100 Bakterienzellen pro Makrophagenzelle infiziert. Die Puffer zur Fixierung der elektronenmikroskopischen Proben sind in Tab. 12 aufgelistet. Wenn eine Färbung mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) vorgenommen wurde, wurden die Zellen für 1 h mit HRP in einer Konzentration von 25 µg/ml inkubiert. Unter diesen Bedingungen wird HRP über den Mannoserezeptor endozytiert (Lang et al., 1988).

Nach 4, 6 und 9 Stunden wurden die Kulturen mit Puffer 1 für 1 h fixiert. Anschließend mit Waschpuffer 3 mal gewaschen. Am nächsten Tag wurden die Proben, die mit HRP inkubiert wurden, wie beschrieben (de Chastellier et al., 1995; Guerin & de Chastellier, 2000), für 15 min bei 22°C mit 3,3'-Diaminobenzidin Tetrachlorhydrat (DAB)  $H_2O_2$  inkubiert.

**Tab. 12: Für die Fixierung der elektronenmikroskopischen Proben verwendete Lösungen**

<b>Waschpuffer</b>	0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer 5 mM Magnesiumchlorid 5 mM Calciumchlorid
<b>Puffer 1</b>	0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer 2,5% iger Glutaraldehyd-Lösung 5 mM Magnesiumchlorid 5 mM Calciumchlorid 3,4% Saccharose.
<b>Puffer 2</b>	0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer 1%ig Osmiumtetroxid 5 mM Magnesiumchlorid 5 mM Calciumchlorid

Danach wurden alle Proben mit Puffer 2 für 1 h fixiert und anschließend wieder 3 mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche entfernt. Einbettung, Schneiden und Dokumentation der Proben wurden von Frau Dr. Chantal de Chastellier nach dem in Guerin & de Chastellier (2000) angegebenen Protokoll vorgenommen.

## 2.16 Westernblot

Die Immunodetektion des TlyA-His6-Fusionsproteine wurde für mich von Frau M. Wolke durchgeführt und mir die Ergebnisse dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Die Trennung der Fraktionen ‚Zellwand‘, ‚Zytoplasma‘ und ‚Zellmembran‘ wurde nach dem Protokoll von Prinzis et al. (1994) vorgenommen.

### 2.16.1 Protein-Konzentrations-Bestimmung

Die Protein-Konzentration wurde mit Hilfe des BioRad (München) Protein Test bestimmt. Als Standard wurde BSA eingesetzt.

### 2.16.2 Immunodetektion

Der Nachweis des TlyA-His6-Fusionsproteine aus *M. smegmatis*-Kulturen wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (10% ‚running‘ und 14% ‚stacking‘) vorgenommen. Das TlyA-His6-Fusionsprotein wurde durch Elektrophoretischer Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran Pure Nitrocellulose Membranes, Schleicher & Schuell, Dassel) gebracht und daraufhin mit einem indirekten Enzym-Immunoverfahren nachgewiesen.

### 2.16.3 Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran

Transferpuffer : 25 mM Tris Glycin, 0,05% (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Der Proteintransfer aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte in einer Apparatur der Firma Bio-Rad (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell). Die Übertragung fand bei einer Stromstärke von 250 mA (1 h bei 0 °C) im angegebenen Transferpuffer statt.

#### 2.16.4 Proteinnachweis durch Immunodetektion

TS-TMBSA: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>,  
0,1 % (v/v) Tween20, 2,0% BSA

Blockierungslösung: 20 % (w/v) Milchpulver in TBST

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem Elektrottransfer für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu unterdrücken und die Membran zu äquilibrieren. Es folgte eine Inkubation ü.N. mit einem 1:1000 in TS-TMBSA verdünnten Antikörper gegen 6His. Danach wurde der Blot 3 mal für je 30 min in PBS/0,1% Tween20 gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper ‚Goat-Anti-Mouse‘ wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in TS-TMBSA bei 25°C für 1 h vorgenommen. Der Nachweis des gebundenen Zweitantikörpers (HRP-GAM, Biorad, München) erfolgte unter Verwendung des ECL-Systems der Firma Amersham (Freiburg) nach Herstellerangaben. Die Dokumentation erfolgte durch 15 min andauernde Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg).

### 2.17 Konstruktion der genomischen DNA-Bank und Identifizierung phagosomal-induzierter Promotoren

Mit dem Vektor pTRAP wurde eine genomische DNA-Bank aus *M. smegmatis* gebaut und auf phagosomal-induzierte Promotoren durchsucht (Abb. 3).

#### 2.17.1 Isolierung genomischer DNA und Partialverdau mit Sau3A

Die Klonierungsstrategie für die genomische DNA entspricht der von Triccas et al. (1999). Genomische DNA wurde von *M. smegmatis* isoliert und mit der Endonuklease Sau3A partial verdaut. Geschnittene DNA wurde auf einem Agarosegel nach der Größe getrennt und Fragmente zwischen 500 und 1500 bp aus dem Gel isoliert. Der Vektor pTRAP wurde mit *Bam*HI verdaut und mit alkalischer Phosphatase (CIAP; Roche, Basel, Schweiz) dephosphoryliert. Die Anzahl der Religanden wurde durch eine Testinsertion erfasst. Dafür wurde aus dem Vektor pBSL141 mit *Bam*HI das Fragment isoliert, das die Gentamycin-Resistenz-Kassette trägt und in ein Aliquot des Vektors inseriert. Nach Transformation wurden die Klone erst auf mit Kanamycin und dann auf mit Gentamycin supplementierten Platten überimpft. Die An-



zahl der Religanden konnte anhand der Anzahl der Klone, die nicht auf mit Gentamycin supplementierten Platten wuchsen, ermittelt werden. Das Verfahren wurde genotypisch verifiziert. Wenn die Anzahl der Religanden über 5 Prozent lag, wurde der Ansatz verworfen und neue Vektor DNA geschnitten und dephosphoryliert. Die Ligationsansätze wurden gefällt und in XL-1 Blue-Zellen (Stratagene, Amsterdam, Niederlande), transformiert.

### **2.17.2 Screening der genomischer DNA-Banken**

Die genomische DNA-Bank aus *M. smegmatis* wurde mit Hilfe von THP-1 durchsucht. Die THP-1-Zellen wurden in mit Kanamycin supplementiertem Medium gehalten. Streptomycin wurde verwendet, um die Mykobakterien, die konstitutive Promotoren trugen zu eliminieren. Kanamycin wurde verwendet, um den Selektionsdruck zu Gunsten des Plasmids aufrecht zu erhalten. THP-1-Kulturen wurden in 6 Well Platten in einer Dichte von circa  $5 \times 10^6$  Zellen ausgesät und mit circa  $1 \times 10^5$  Bakterienzellen infiziert. Das ergab eine Infektionsrate (*multiplicity of infection*) von circa 0,02. Es wurde diese verhältnismäßig niedrige Infektionsrate gewählt, um möglichst wenig unphagozytierte Bakterien in der Kultur zu haben. Zwei Stunden nachdem die Bakterien in die Makrophagenkultur gebracht wurden, wurden extrazelluläre Bakterien mit Gentamycin (Endkonzentration 100µg/ml) abgetötet. Das mit Gentamycin supplementierte Medium wurde nach 20 min Inkubation durch Zentrifugation von den Makrophagen getrennt und diese 2 mal mit Medium gewaschen. 24 Stunden später wurden die Makrophagen abzentrifugiert und auf eine neue Makrophagenkultur gegeben. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Anzahl der Makrophagen nicht abnahm, sondern, der Anteil an extrazellulären Bakterien kleiner wurde. Ab dem 6. Tag wurden Aliquots der durchsuchten Bank auf mit Kanamycin supplementierten LB-Platten aufgetragen. Nach dem 8 Tag wurde das Screening beendet.

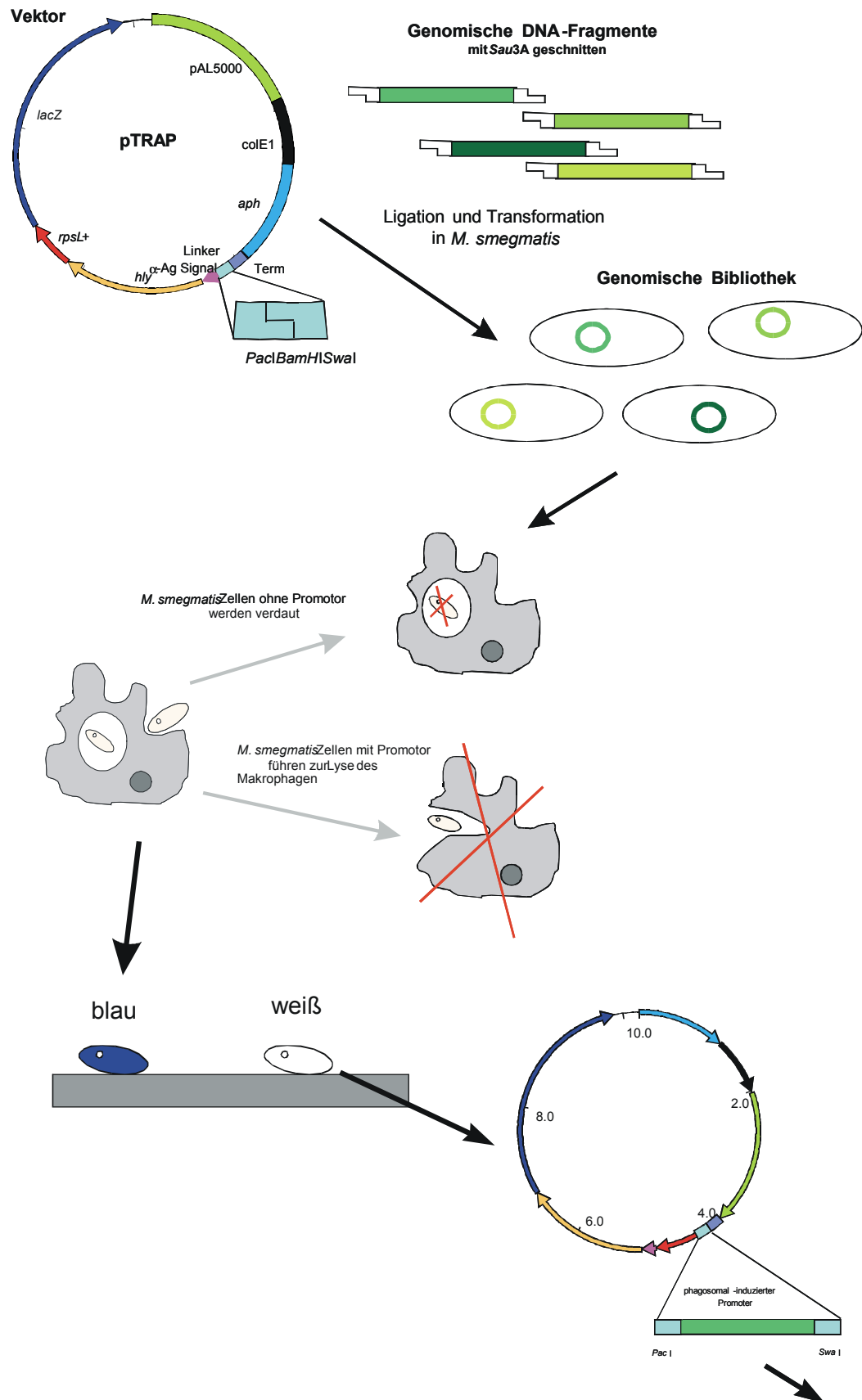


Abb. 3: Schema der Konstruktion der genomischen DNA-Bank und des Screenings.

## 2.18 Messung der Promotorstärke

Bei der Bestimmung der Expressionsrate eines Genes besteht das generelle Problem, dass das Expressionssignal (die Menge an spezifischer mRNA, die Menge des gebildeten Proteins oder das Signal eines Reporter-Genes) von (mindestens) zwei Faktoren abhängig ist. Der Promotorstärke und der Biomasse der untersuchten Kultur. Es ist daher notwendig das Expressionssignal auf einen Biomasseparameter oder einen Parameter für die Gesamtexpressionsrate zu beziehen.

Für Promotoren, die mit Hilfe des unter 3.9 (S. 67) beschriebenen Systems identifiziert wurden, wurde die Promotorstärke mit Hilfe von zwei Methoden bestimmt. Zum einen wurde ein System aufgebaut, das auf dem Vergleich zweier Promotoren basiert. Als Bezugsgröße wurde dabei die Expressionsrate des *rpsL* Promotors gewählt, die durch einen *luxAB*-Assay gemessen werden konnte. Der Promotor, dessen Expressionsrate erfasst werden sollte, wurde mit einem Fluoreszenz basierten *lacZ*-Assay erfasst. Zum anderen wurde das isolierte Fragment in den Vektor pPGFP umklont und die GFP-Expressionsrate fluorimetrisch erfasst.

### 2.18.1 Konstruktion der Vektoren zur Messung der Promotorstärke

Um die mit Hilfe des Vektors pTRAP isolierten Promotoren weiter zu charakterisieren, wurden Promotorstärkemessungen durchgeführt. Für die Durchführung dieser Messungen wurden zwei DNA-Vektorsysteme konstruiert, mit denen die Promotorstärke erfassbar wurde.

### 2.18.2 *lacZ/luxAB* Nachweis

Für die Messung der extra- und intrazellulären Promotorstärke musste die  $\beta$ -Galactosidase- und Luziferase-Aktivität in zwei getrennten Messverfahren ermittelt werden, da der *lacZ*-Nachweis in einem für das Substrat geeigneten Puffer durchgeführt werden muss. Aus diesem Grund wurde immer zuerst die Luziferase-Aktivität bestimmt, dann die Bakterienzellen vom Medium getrennt und in dem für die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität notwendigem Puffer aufgenommen. Da die phagozytierten Bakterien nicht frei suspendiert, sondern intrazellulär in den adhären Phagozyten waren, war eine Zentrifugation nur bei den extrazellulären Bakterien nötig. Diese wurde für 3 min bei 1000 g durchgeführt. Aus diesem Zentrifugationsschritt ergab sich ein systematischer Fehler durch Verlust von Bakterien.

### 2.18.2.1 Messung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

Die Quantifizierung der  $\beta$ -Galactosidase erfolgte über die enzymatische Umsetzung des Substrates CUG (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), das nach Spaltung fluoreszierend ist. Für diese Reaktion wurde das ‚FluoReporter $lacZ$ /Galactosidase Quantitation Kit‘ von Molecular Probes verwendet. Die Fluoreszenz des Produktes wurde mit dem Fluoreszenzmessgerät Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und Emissionswellenlänge bei 460 nm gemessen.

### 2.18.2.2 Erfassung der bakteriellen Luziferase-Aktivität

Die Biolumineszenz, die aus der Aktivität der bakteriellen Luziferase von *Vibrio harveyi* resultierte, wurde über die Licht Emission mit dem Fluoreszenz-Lumineszenz-Messgerätes Victor<sup>2</sup> erfasst. Als Substrat wurde 0,1%iges (Endkonzentration) n-decyl Aldehyd direkt zu der Bakterienkultur gegeben. Im Gegensatz zu dem von Snewin et al. (1999) beschriebenen Protokoll wurde n-decyl Aldehyd in Wasser und nicht in Ethanol gelöst und durch vortexen suspendiert. Erhöhung auf 1%iges bzw. Verringerung auf 0,01%iges n-decyl Aldehyd zeigte eine Abweichung von weniger als 5%, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Substrat im Überschuss bei dieser Konzentration vorliegt. Die Biolumineszenz wurde in dem jeweiligen Kulturmedium vorgenommen, da dieses keinen erkennbaren Einfluss auf die Hintergrundlumineszenz hatte.

### 2.18.3 Quantifizierung der GFP-Konzentration

Die GFP-Konzentration wurde mit zwei Methoden über die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Messmethoden sind Tab. 13 zu entnehmen.

**Tab. 13: Verwendete Geräte und Einstellungen zur Erfassung der GFP Fluoreszenz.**

Gerät	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Zeiss Axioskop 2 mit AxioCamHRc Kamera	470 nm	510-530 nm
Victor <sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter	485 nm	510 nm

Für die Messung der Promotorstärke mittels Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen mit 3%iger Paraformaldehyd PBS für 15 min fixiert. Danach 3 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben in Mowiol (Hoechst, Straßburg, Frankreich) eingebettet.

## 2.19 Computeranalyse

Die DNA- und Protein-Sequenzvergleiche wurden unter den Internetadressen, die in Tab. 14 aufgeführt sind, durchgeführt.

**Tab. 14: Internetadressen für den Sequenzvergleich von DNA und Proteinen**

Institut	Internetadresse
Institute for Genomic Research (TIGR)	<a href="http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?organism=m_smeigmatis">www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?organism=m_smeigmatis</a> <a href="http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?organism=m_avium">http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?organism=m_avium</a> <a href="http://tigrbblast.tigr.org/cmr-blast/">http://tigrbblast.tigr.org/cmr-blast/</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
Sanger Centre	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/blast_server.shtml">http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/blast_server.shtml</a> <a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/blast_server.shtml">http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/blast_server.shtml</a>

Die Analyse von Promotoren und die Erfassung von möglichen –10 Regionen wurde mit dem Programm ‚NNPP‘ unter der folgenden Internetadresse vorgenommen:

[http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)

Die Vorhersage einer Transmembrandomäne wurde mit dem Programm ‚TMPred‘ und dem Programm ‚SOSUI‘ vorgenommen. Die Internetadressen lauten:

[http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

[http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosui\\_submit.html](http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosui_submit.html)

Das Dendrogram von TlyA aus verschiedenen Arten wurde mit dem Computerprogramm CLUSTALW erstellt. Es ist unter der folgenden Internetadresse zu finden:

<http://clustalw.genome.ad.jp/>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung des *tlyA*

Für die Untersuchung von *tlyA* musste das Gen zunächst kloniert werden. Die Klonierung wurde mittels PCR vorgenommen. Für die PCR wurde DNA aus dem *M. bovis* BCG-Stamm Chicago verwendet, der auf Schafblutplatten Hämolyse erkennen lässt (Abb. 4).

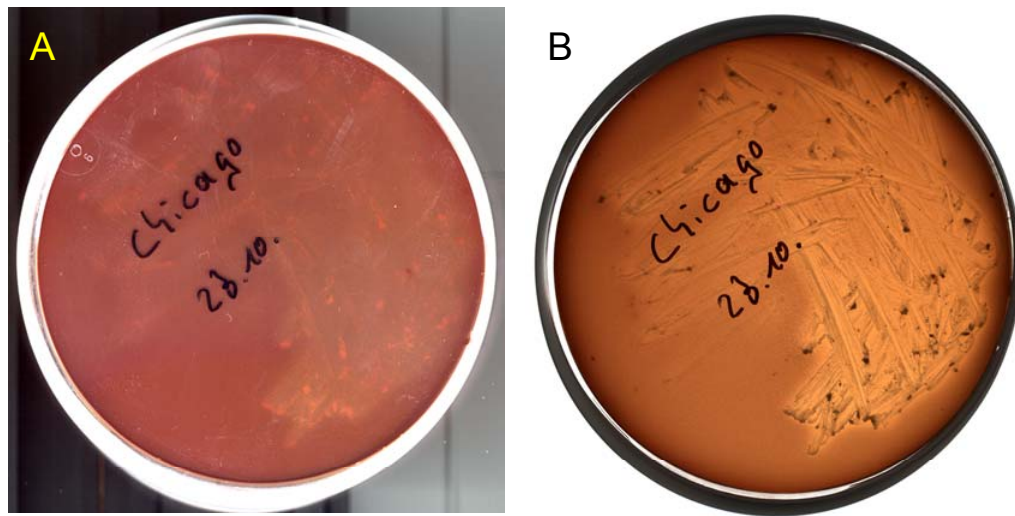


Abb. 4: Hämolytische Aktivität von *M. bovis* BCG auf Blutplatten. A: Aufnahme mit Auflicht, B: Aufnahme mit Durchlicht.

Die PCR-Reaktion wurden unter Verwendung der Oligonukleotide ‚fw Tly GF‘ und ‚rw TlyA‘ durchgeführt. An das 5‘-Ende dieser Oligonukleotide war eine *KpnI*-Schnittstelle angehängt, so dass sich das PCR-Fragment in die *KpnI*-Schnittstelle des Vektors pAT261 inserieren ließ. Der Vektor pAT261 wurde durch einen *PstI*-Verdau des Plasmids pAT261:*hly* und anschließende Religation des Vektors hergestellt. Die Sequenz wurde mittels mehrfacher Sequenzierung verifiziert.

Die Klonierung von *hly* war nicht notwendig, da mir der *hly*-tragende Expressionsvektor pAT261:*hly* freundlicherweise von Dr. Jürgen Hess zur Verfügung gestellt wurde.

### 3.2 Überlebensraten von *hly*- und *tlyA*-exprimierenden *M. smegmatis*-Transformanten in Makrophagenkulturen

Die Expression von *hly* hat auf die Überlebensrate von pathogenen und apathogenen Bakterien in Makrophagenkulturen einen sehr unterschiedlichen Effekt wie unter 4.1 (S. 88) dargestellt. Der Einfluss von Listeriolysin (dem Genprodukt von *hly*) auf das intrazelluläre Überleben von *M. smegmatis* musste deshalb experimentell bestimmt werden.

*tlyA* wurde mit der Virulenz verschiedener pathogener Bakterienarten in Verbindung gebracht (Hyatt et al., 1994; Martino et al., 2001; Wren et al., 1998). Trotzdem ist der Einfluss von *tlyA* auf die Überlebensrate von Mykobakterien nicht untersucht.

Um die Hypothese zu testen, dass *hly* und *tlyA* einen positiven Überlebensfaktor für *M. smegmatis* in Makrophagenkulturen darstellt, wurden zwei Versuchsansätze benutzt, die in Abb. 1 (S. 26) wiedergegeben sind. Diese Versuchsansätze unterscheiden sich darin, dass einerseits die unterschiedlichen Klone getrennt voneinander und andererseits die Klone in der selben Makrophagenkultur untersucht wurden. Der Vorteil des ersten Versuchsansatzes ist, dass sich die beiden Klone nicht gegenseitig in der Überlebensrate beeinflussen können. Der Vorteil des zweiten Versuchsansatzes liegt darin, dass beide Klone identischen Versuchsbedingungen unterzogen sind. Ein Nachteil des zweiten Versuchsansatzes ist, dass ein Reporter-Gen benutzt werden muss, um die beiden Klone unterscheiden zu können. Die Expression eines Reporter-Genes kann zu Artefakten führen. Beide Versuchsansätze müssen deshalb mit jeweils einem unterschiedlichen Kontrollvektor durchgeführt werden. Zum einen wurde der Vektor pAT261 (Abb. 5 A) benutzt. Zum anderen wurde das Leseraster des *hly* durch die Insertion von *lacZ* in die *EcoRV* des *hly* unterbrochen (Abb. 5 B), so dass kein funktionstüchtiges Listeriolysin mehr gebildet werden kann. Der resultierende Vektor wird pAT261:*lacZ* genannt.

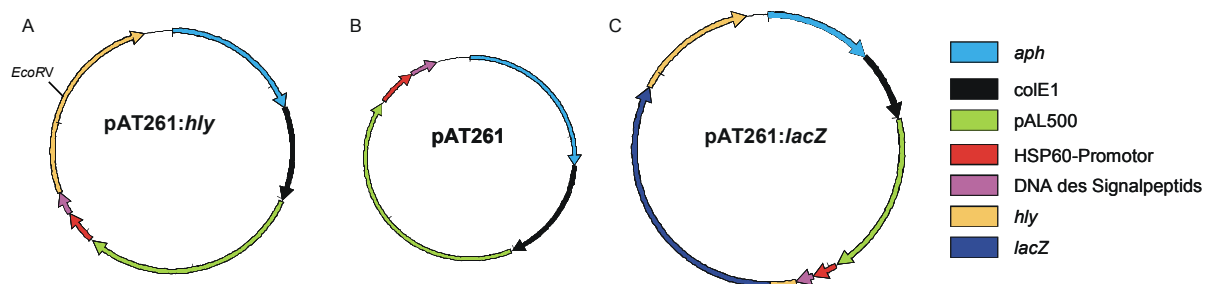
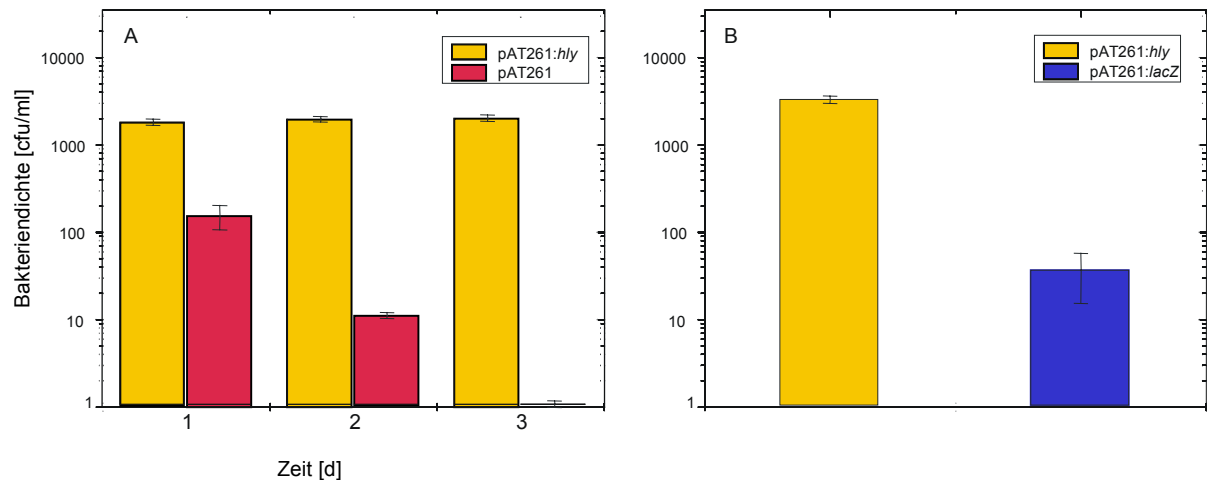


Abb. 5: Plasmide zur Untersuchung der Überlebensrate von *M. smegmatis* in Makrophagenkulturen.

Die Überlebensraten wurden zum einen für humane Makrophagen, die aus peripheren Blutzellen gewonnen wurden, als auch für die humane Makrophagenzelllinie THP-I ermittelt. Die Ergebnisse der CFU-Zählungen sind in Abb. 6, Abb. 7 und Abb. 8 dargestellt.

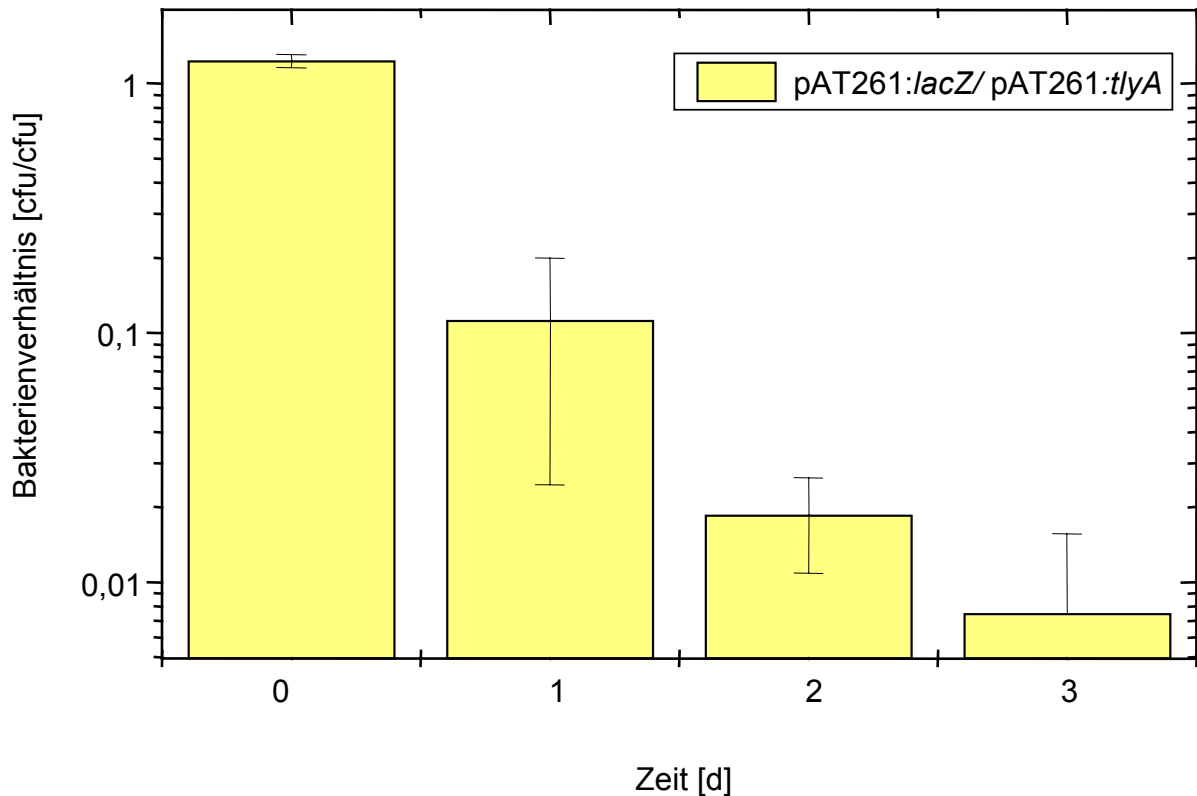


**Abb. 6: Bakteriendichte in HMDM-Kulturen.** In (A) sind die beiden Transformanten in getrennten Makrophagenkulturen über einen Zeitraum von drei Tagen untersucht worden. In (B) sind *hly*- und *lacZ*-exprimierende Transformanten verglichen, mit denen dieselbe Makrophagenkultur infiziert wurde. Es ist für diesen Versuch nur der erste Tag wiedergegeben, weil danach keine blauen Kolonien mehr nachweisbar waren.

Wie in Abb. 6 A zu erkennen ist, sinkt die Anzahl der CFU pro ml der Transformanten ohne *hly*-Expression ca. um den Faktor zehn innerhalb von 24 h. *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen hingegen zeigen keine signifikante Abnahme der Bakteriendichte. Bei Koinfektion von *lacZ*- und *hly*-exprimierenden Transformanten konnten nach dem ersten Tag keine blauen Kolonien mehr nachgewiesen werden. 24 h nach der Infektion finden sich ungefähr 200 mal so viele *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen in der Makrophagenkultur wie *lacZ*-exprimierende. Um auszuschließen, dass das Fehlen von blauen Kolonien nicht auf Grund des Verlustes von *lacZ* auftritt, wurden *M. smegmatis:lacZ*-Kulturen für 10 Tage in Medium gehalten und anschließend auf mit x-gal supplementierten Platten ausplattiert. Alle Kolonien zeigen weiterhin eine Blaufärbung, so dass ein Verlust des Plasmids während der Makrophagenversuche unwahrscheinlich ist.

Durch die beiden Experimente konnte die Hypothese gefestigt werden, dass *hly* einen positiven Selektionsfaktor für *M. smegmatis* in Makrophagenkulturen darstellt.





**Abb. 7:** Verhältnis der Bakteriendichte von *lacZ*- zu *tlyA*-exprimierenden Zellen in der selben THP-1-Kulturen. Bakterienkolonien wurden anhand der Blaufärbung unterschieden. Transformanten mit *lacZ*-Expression zeigen auf x-gal-Agarplatten Blaufärbung. Das Verhältnis von blauen zu weißen Kolonien der Bakteriensuspension, mit der die THP-1-Kultur infiziert wurde, ist mit dem Tag 0 wiedergegeben.

Die Überlebensrate von *M. smegmatis*-Transformanten, die *tlyA*-exprimieren, wurde in den gleichen Versuchsansätzen wie für das *hly* durchgeführt (Abb. 1). Das heißt, es wurden sowohl Klone in getrennten Ansätzen untersucht (Abb. 8), als auch Klone in der selben Makrophagenkultur erfasst (Abb. 7). Für diese Versuche wurden die Kontrollplasmide pat261 und pat261:*lacZ*, die in Abb. 5 B und C wiedergegeben sind, verwendet.

In Abb. 7 sind die Ergebnisse im Vergleich zu *lacZ*-exprimierenden Zellen dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass das Verhältnis *lacZ*- zu *tlyA*-exprimierenden Zellen mit der Zeit abnimmt. *tlyA*-Transformanten haben also gegenüber dem Wildtyp vergleichbaren Zellen einen Überlebensvorteil in Makrophagenkulturen.

In einem zweiten Experiment wurde das Überleben von *M. smegmatis*:pat261 mit dem von *tlyA*- und *hly*-exprimierenden Transformanten in getrennten Ansätzen in THP-I-Kulturen untersucht. Dafür wurde die Anzahl der CFU in Zeitintervallen von 24 h ermittelt. Wie in Abb. 8 erkennbar ist, nimmt die Zahl der lebenden Bakterienzellen bei *M. smegmatis*:pat261 mit der Zeit deutlich ab, während sie bei *tlyA*- oder *hly*-Expression auf einem verhältnismäßig hohen Niveau bleibt.

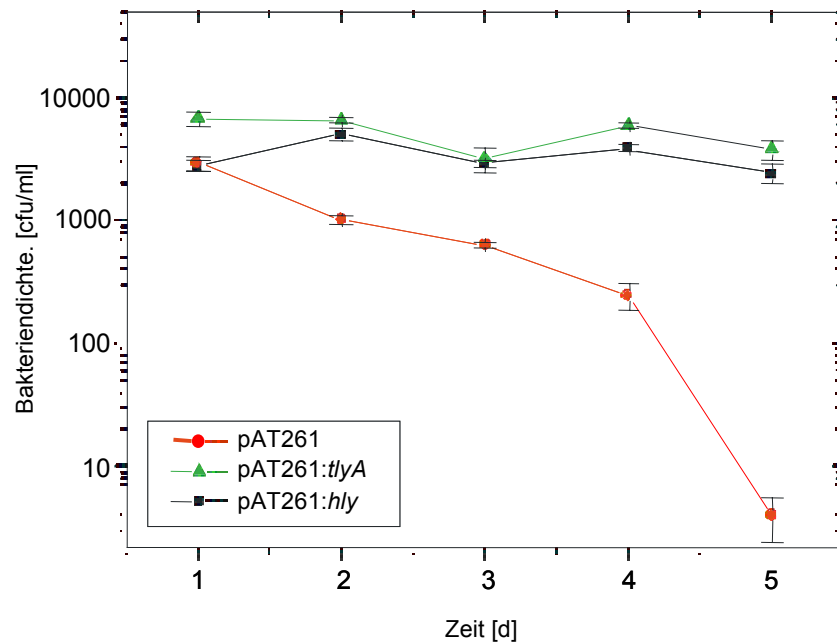


Abb. 8: Überlebensrate von *M. smegmatis*:pAT261 zu *tlyA*- und *hly*-exprimierenden Zellen in THP-1 Makrophagen.

### 3.3 Zytotoxizität der Hämolyse auf Makrophagen

Listeriolysin und TlyA sind Proteine mit hämolytischer Aktivität (Geoffroy et al., 1987; Wren et al., 1998). Eine Schädigung des Makrophagen durch Listeriolysin wurde für THP-1-Zellen in zwei aufeinanderfolgenden Versuchen erfasst. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Anzahl der Makrophagen infizierter Kulturen im Verhältnis zu einer nicht infizierten Kontrollkultur ist in Prozent in Abb. 9 wiedergegeben.

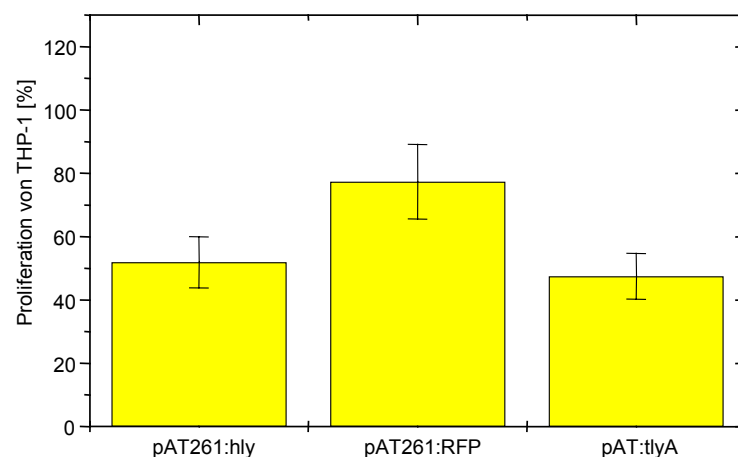
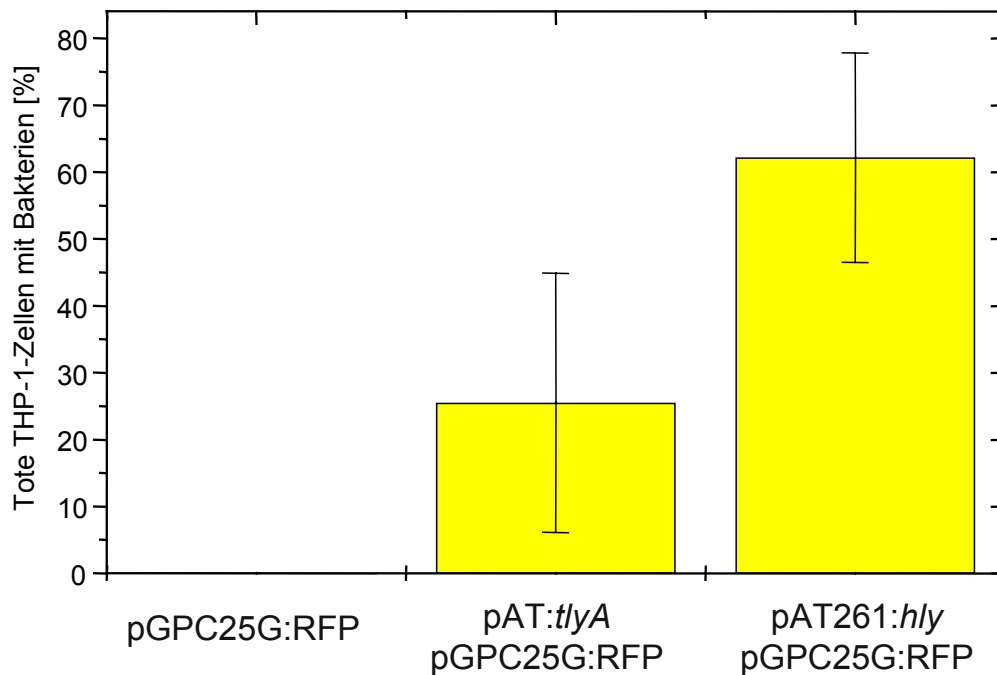


Abb. 9: Proliferation der THP-1-Makrophagen bei Infektion mit *M. smegmatis*, die RFP (als nicht zytotoxisches Kontrollprotein), *tlyA*- oder *hly*-exprimieren. Die Proliferationsrate der infizierten THP-1-Kultur ist dargestellt in Prozent zu der Proliferationsrate einer THP-1-Kontrolle, die nicht mit Bakterien infiziert wurde.

Um den Zusammenhang zwischen der verminderten Proliferationsrate von THP-1-Zellen und der Infektion genauer zu untersuchen, wurden THP-1-Kulturen erneut mit *M. smegmatis*-Transformanten infiziert, die entweder nur RFP oder RFP und *tlyA*- oder *hly*-exprimierten. Dafür wurden die Plasmide pGPC25G:RFP, pAT261:*hly* und pAT261:*tly* verwendet. 4 h nach der Infektion wurden die mit Trypanblau gefärbten toten Makrophagen gezählt und dabei unterschieden zwischen Makrophagenzellen, die nicht mit Bakterien assoziiert waren und solchen, die Bakterien phagozytiert hatten oder an deren Zellmembran Bakterien adhärirt waren.



**Abb. 10:** Anteil der Makrophagen, die mit Bakterienzellen assoziiert sind, an der Anzahl aller mit Trypanblau gefärbten Zellen. Die Makrophagenkultur wurde mit *M. smegmatis*-Zellen infiziert, die entweder ausschließlich RFP oder RFP und *tlyA*- oder *hly*-exprimieren. Die *tlyA*- und *hly*-exprimierenden Bakterien sind jeweils mit zwei Plasmiden transformiert worden.

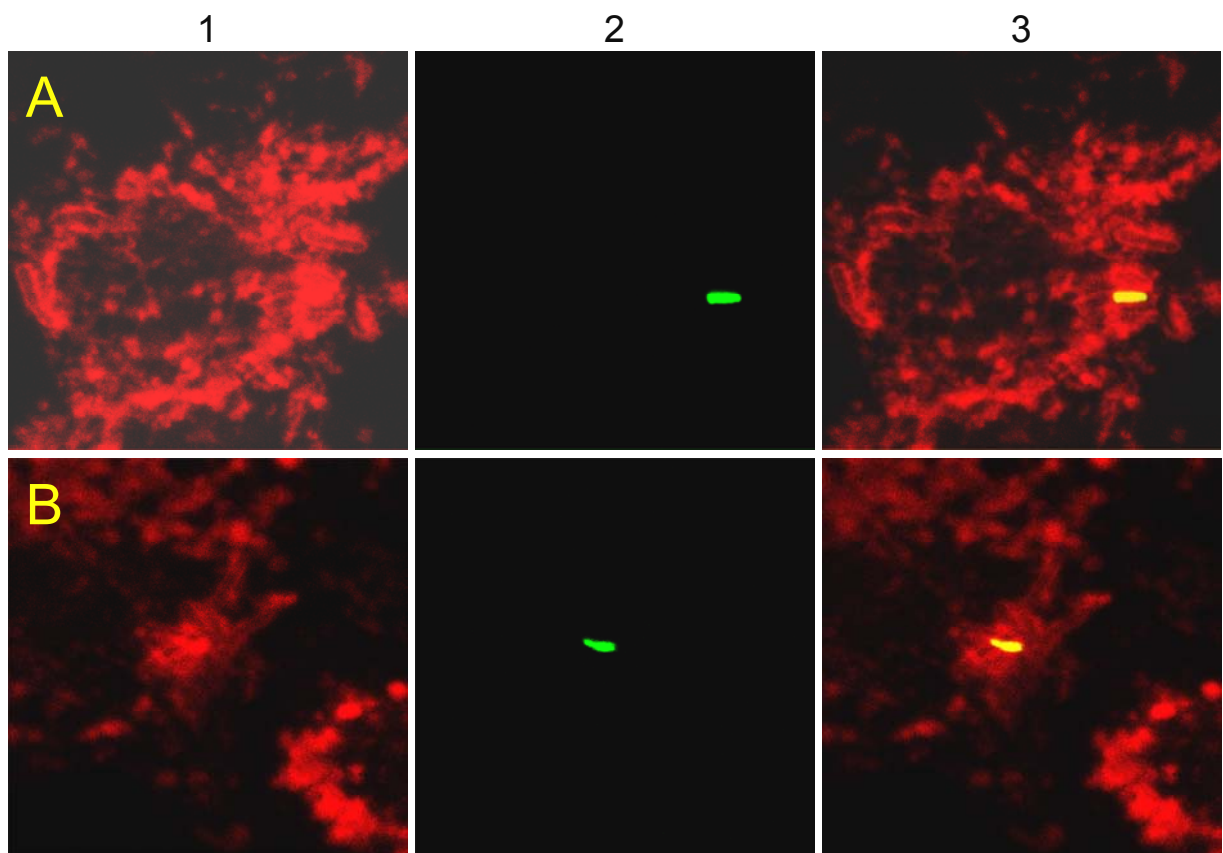
THP-1-Zellen, die *tlyA*- oder *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen phagozytiert haben, eine erhöhte Sterberate als THP-1-Zellen, die *M. smegmatis* phagozytiert haben, die dem Wildtyp entsprechen. So wurden keine THP-1-Zellen gefunden, die Wildtyp entsprechende Bakterien aufgenommen hatten und sich mit Trypanblau anfärben ließen (Abb. 10). Bei *tlyA*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen hingegen sind ca. 25 % aller toten THP-1-Zellen mit Bakterien assoziiert, bei *hly*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen sind es über 60%.

### 3.4 Antikörpernachweis von Lamp-1 und Transferrin-Rezeptor

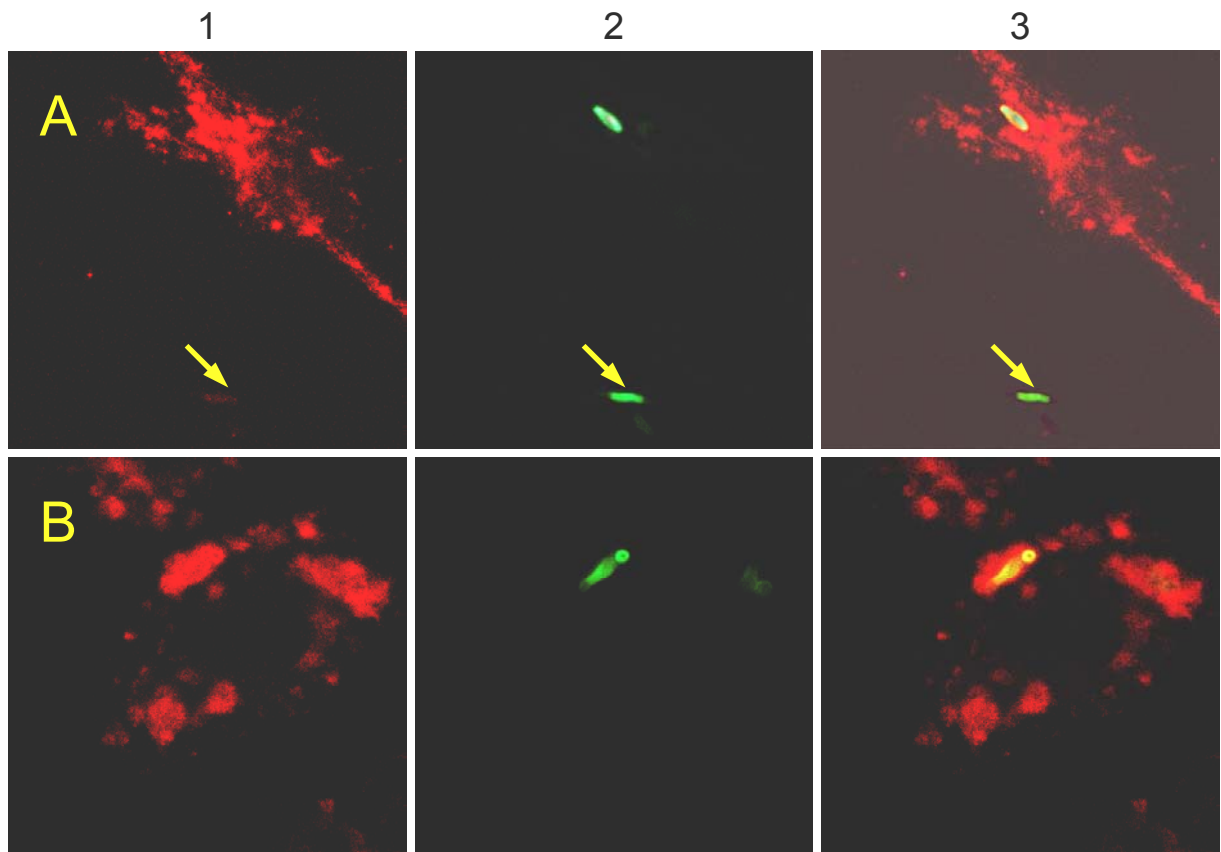
Das Phagosom von pathogenen Mykobakterien weist das lysosomale Membran-Protein Lamp-1 auf (Deretic & Fratti, 1999). Da Lamp-1 membranassoziiert ist (Winchester, 2001),

kann es benutzt werden um die lysosomale Membran sichtbar zu machen. Durch die Untersuchung der Kolo-kalisation von Lamp-1 und *M. smegmatis*-Transformanten sollte gezeigt werden, dass sich *hly*- und *tlyA*-exprimierende *M. smegmatis* in Lamp-1 positiven Kompartimenten befinden.

Die Infektion von RAW 264.7-Zellen wurden mit unterschiedlichen *M. smegmatis*-Transformanten vorgenommen. Für die Transformation von *M. smegmatis* wurden die Plasmide pAT261, pAT261:*tlyA* und pAT261:*hly* verwendet. In den lasermikroskopischen Bildern sind die Bakterien mit FITC gefärbt. Die Infektionsrate lag bei 1. Die Ergebnisse der Lamp-1 Antikörperfärbung sind in Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 13 wiedergeben.

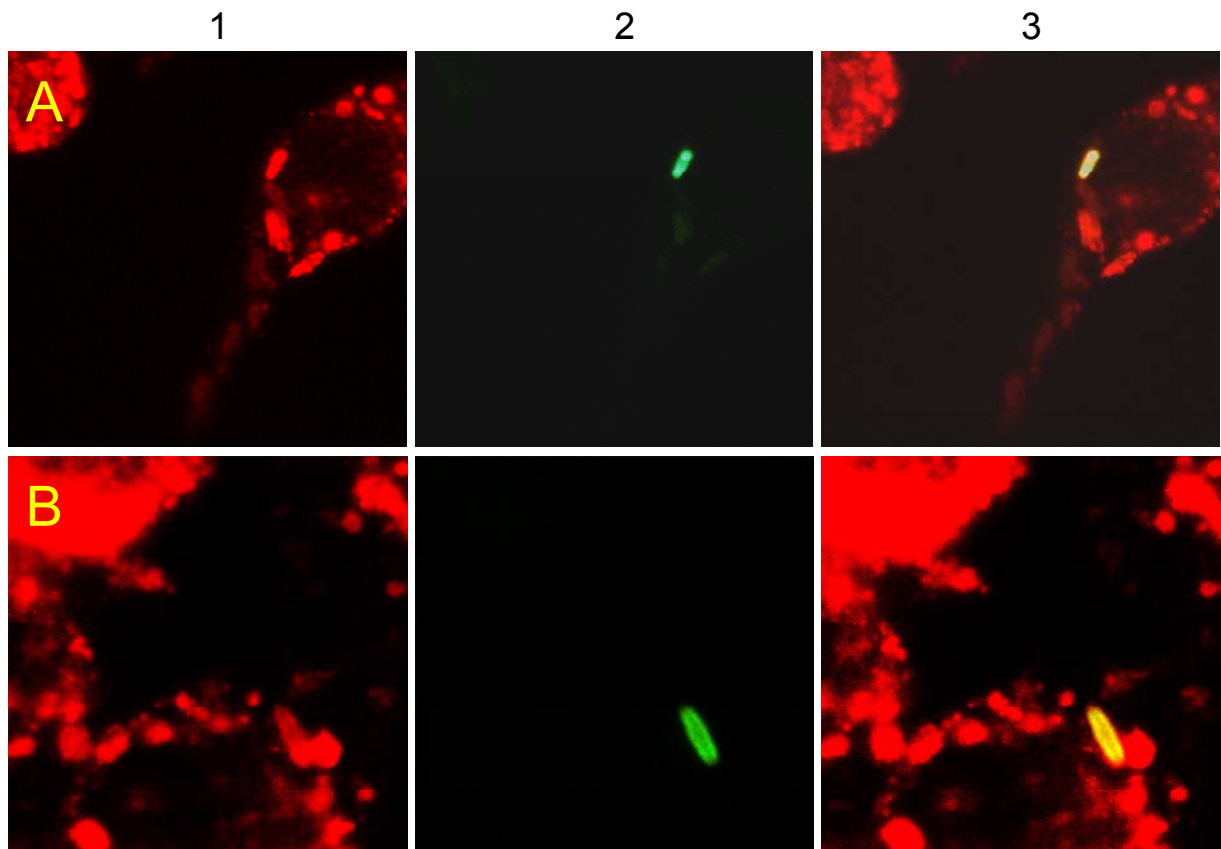


**Abb. 11:** Mit monoklonalem Antikörper gegen Lamp-1 gefärbte RAW 264.7-Zellen bei einer Infektionsrate von 1 mit *M. smegmatis*:pAT261. Die mit 1 beschriftete Spalte zeigt den roten Kanal, die mit 2 den grünen und die mit 3 die Überlagerung der Kanäle. Die Länge des Bildes entspricht 26,3 μm in (A) und 30,9 μm in (B).



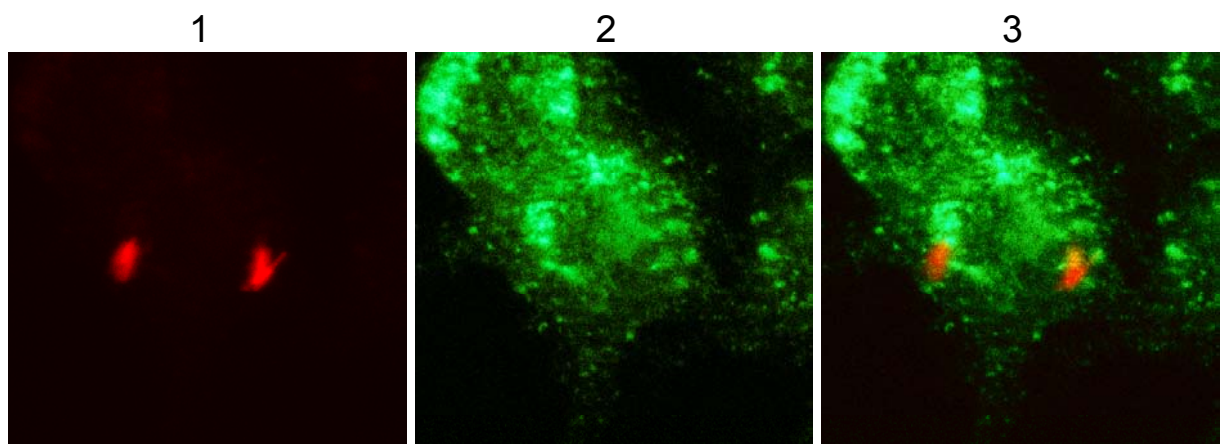
**Abb. 12:** Nachweis von Lamp-1 in RAW 264.7-Zellen, die mit *thyA*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen bei einer Infektionsrate von 1 infiziert wurden. Ein extrazelluläres Bakterium ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Darstellung der Fluoreszenzkanäle ist identisch mit der in Abb. 11. Die Bildlänge entspricht in (A) 49,4  $\mu\text{m}$  und in (B) 30,8  $\mu\text{m}$ .

Alle RAW 264.7-Zellen zeigen Kompartimente, die sich mit einem Anti-Lamp-1-Antikörper anfärben lassen. Die Kolokalisation zwischen Lamp-1 positiven Kompartimenten und Bakterien konnte für alle drei *M. smegmatis*-Transformanten aufgezeigt werden. Bakterien, die frei im Zytoplasma vorlagen oder von einer Lamp-1 negativen Membran umgeben waren, konnten nicht gefunden werden. Extrazelluläre Bakterien weisen im roten Kanal nur ein sehr schwaches Signal auf (Abb. 11, Pfeil). Die rote Fluoreszenz resultiert somit nicht aus der Autofluoreszenz der Bakterien, sondern von dem Cy3-markiertem Zweitantikörper.



**Abb. 13:** Mit *hly*-exprimierenden *M. smegmatis* infizierte RAW 264.7-Zellen, die gegen Lamp-1 gefärbt wurden. Die Darstellung der Fluoreszenzkanäle entspricht der in Abb. 11. Die Bildlänge in (A) entspricht 37,1  $\mu\text{m}$ , die in (B) 21,4  $\mu\text{m}$ .

In Abb. 14 bis Abb. 17 ist die Verteilung Transferrin-Rezeptor positiver Kompartimente in RAW 264.7-Zellen erkennbar, die mit BCG oder mit *M. smegmatis*-Transformanten infiziert wurden, die entweder das Plasmid pAT261, pAT261:*hly* oder pAT261:*tlyA* tragen.



**Abb. 14:** Verteilung des Transferrin-Rezeptors in RAW 264.7-Zellen, die mit *M. smegmatis*:pAT261 infiziert wurden. Der rote Fluoreszenzkanal ist mit 1 überschrieben, der grüne mit 2 und die Überlagerung beider Kanäle mit 3. Die Bildlänge entspricht 43,5  $\mu\text{m}$ .



In Abb. 14 ist erkennbar, dass RAW 264.7-Zellen, die mit *M. smegmatis*:pAT261 infiziert wurden, 4 h nach der Infektion fast kein Signal für den Transferrin-Rezeptor aufweisen. Bei RAW 264.7-Zellen, die mit *tlyA*-exprimierenden Transformanten infiziert wurden, zeigen sich z.T. vereinzelte Stellen im Phagosom, die Transferrin-Rezeptor positiv sind (Abb. 15, Pfeile). Die Mehrzahl dieser Phagosomen ist Transferrin-Rezeptor negativ.

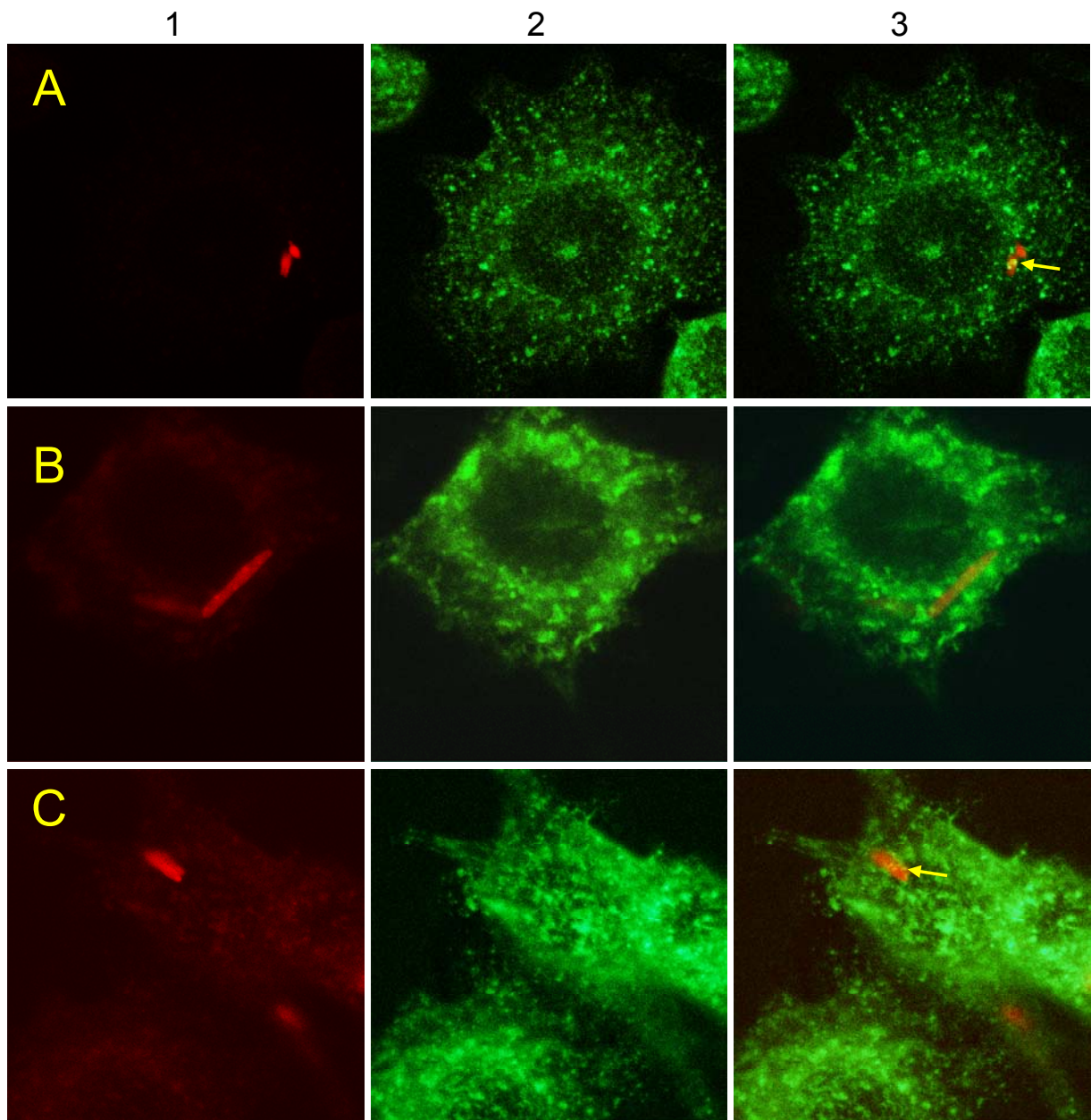
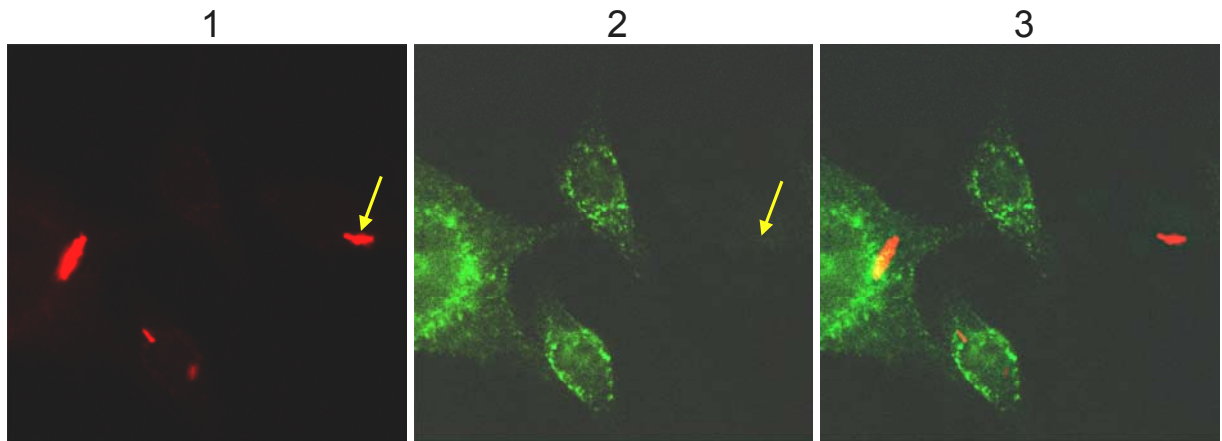


Abb. 15: Antiköpernachweis von Transferrin-Rezeptor in RAW 264.7-Zellen, die mit *M. smegmatis*:*tlyA* infiziert wurden. Die gelben Pfeile weisen auf Stellen im Phagosom hin, die Transferrin-Rezeptor ausweisen. Die Beschriftung der Fluoreszenzkanäle entspricht der von Abb. 14. Die Länge des Bildes entspricht in (A) 56,7  $\mu\text{m}$ , 31,2  $\mu\text{m}$  in (B) und 42,4  $\mu\text{m}$  in (C).



**Abb. 16:** Transferrin-Rezeptor in RAW 264.7-Zellen 4 h nach der Infektion mit *M. smegmatis:hly*. Der Pfeil weist auf ein extrazelluläres Bakterium. Die Beschriftung der Fluoreszenzkanäle entspricht der von Abb. 14. Die Bildlänge entspricht 81,8  $\mu\text{m}$ .

Wie man in Abb. 16 sehen kann, sind die Phagosomen von *M. smegmatis:hly* Transformanten in RAW 264.7-Zellen für den Transferrin-Rezeptor negativ. Es sind auch keine einzelnen Stellen im Phagosom erkennbar, die positiv sind, wie bei *M. smegmatis:tlyA*-Transformanten (Abb. 15). Extrazelluläre Bakterien weisen im grünen Kanal fast kein Fluoreszenzsignal auf (Abb. 15, Pfeil). Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass das Signal im grünen Kanal ausschließlich vom mit FITC-markierten monoklonalen Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor kommt.



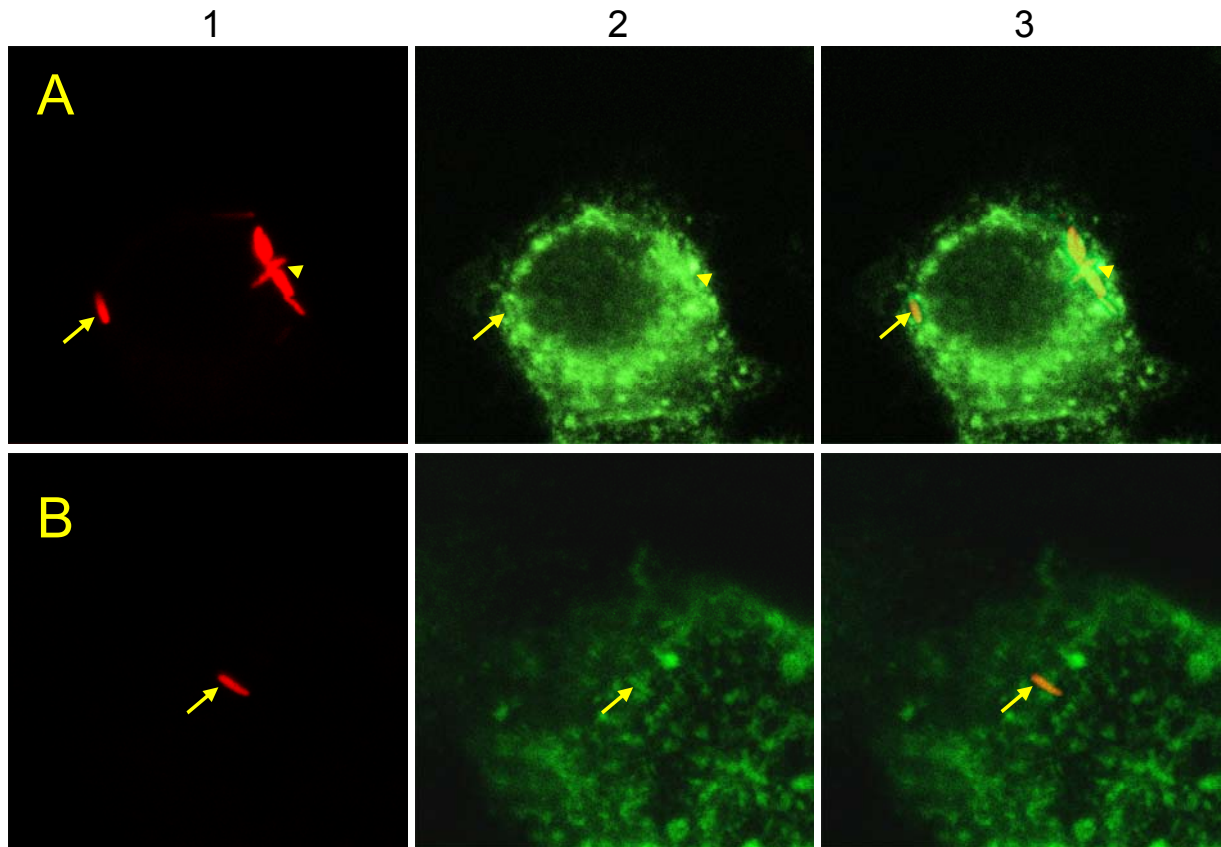


Abb. 17: RAW 264.7-Zellen, die mit *M. bovis* BCG und einem monoklonalem Antikörper gegen TR gefärbte wurden. Die Pfeile zeigen auf einzelne Bakterien, die Pfeilspitzen auf eine Zusammenlagerung von Bakterien. Die Beschriftung der Fluoreszenzkanäle entspricht der von Abb. 14. Die Breite des Bildes entspricht 34,3  $\mu\text{m}$  in (A) und 58,8  $\mu\text{m}$  in (B).

Phagosomen, die *M. bovis* BCG-Zellen beinhalten, sind Transferrin-Rezeptor positiv (Abb. 17). Das gilt sowohl für Phagosomen, die mehrere Bakterienzellen beinhalten, als auch für Phagosomen mit nur einer Bakterienzelle.

### 3.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

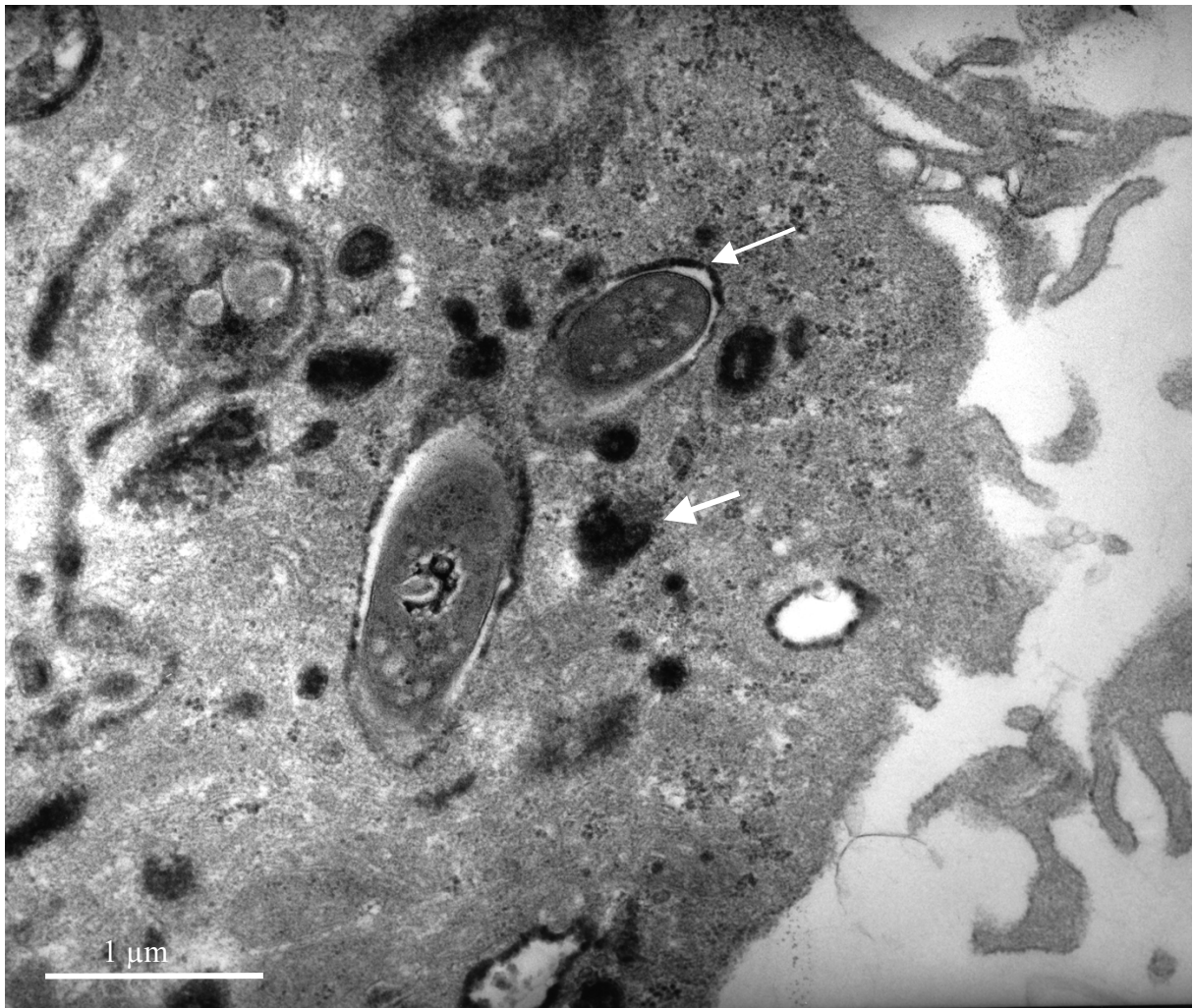
Die Expression von Listeriolysin führt bei *Escherichia coli*, *Salmonella dublin* (Gentshev et al., 1995) und *Bacillus subtilis* (Bielecki et al., 1990) zur Auflösung der phagosomalen Membran. *Mycobacterium bovis* BCG (Hess et al., 1998) hingegen verbleibt bei *hly*-Expression im Phagosom von Makrophagen.

Die potentielle Wirkung von rekombinantem *tlyA* auf die phagosomale Membran wurde bisher nicht untersucht. Bakterienarten, die verschiedene homologe *tlyA*-Gene besitzen, zeigen intrazellulär in Makrophagen sehr diverse Phänotypen. (Ein Sequenzvergleich der homologen Proteine ist unter 3.8 (Tab. 15, S. 64) dargestellt). *M. avium* und *M. tuberculosis* lösen die phago-

somale Membran nicht auf (Clemens, 1996; Clemens & Horwitz, 1995; de Chastellier et al., 1995; de Chastellier & Thilo, 1998; de Chastellier & Thilo, 1997; Frehel et al., 1986; Frehel et al., 1991; Harth et al., 1996). Im Gegensatz dazu lösen die ebenfalls *tlyA* positiven *Rickettsia*-Arten *R. prowazekii* und *R. conorii* die phagosomale Membran auf und liegen frei im Zytoplasma vor (Silverman & Wisseman, 1979; Teyssie et al., 1995). *Helicobacter pylori* ist nach Phagozytose von einer phagosomalen Membran umgeben, in den Phagosomen befinden sich aber z.T. sehr viele Bakterienzellen (Allen et al., 2000). Welche Wirkung die Poren bildenden Hämolytine Listeriolysin und TlyA bei Expression in *M. smegmatis* auf die phagosomale Membran haben, konnte deshalb nur experimentell ermittelt werden.

Um das Vorhandensein der phagosomalen Membran zu überprüfen, wurden elektronenmikroskopische Präparate von *M. smegmatis*-Zellen hergestellt, die die Plasmide pAT261, pAT261:*hly* und pAT261:*tlyA* tragen und von Makrophagen phagozytiert wurden. Um das Vorhandensein einer phagosomalen Membran leichter nachweisen zu können, wurden die endosomalen Kompartimente mit HRP gefärbt.

In Abb. 18 sind Zellen von *M. smegmatis*, die das Plasmid pAT261 tragen und 9 h nach der Infektion fixiert wurden, zu sehen. Endosomales Kompartiment ist HRP-bedingt schwarz gefärbt. Die *M. smegmatis* tragenden Phagosomen sind ebenfalls durch HRP gefärbt.



**Abb. 18:** *M. smegmatis*:pAT261-Zellen, die von einem humanen Makrophagen phagozytiert wurden. Die Proben wurden nach 9 h fixiert. Endosomale Kompartimente sind mit HRP gefärbt und mit Pfeilen markiert.

Auch *tlyA*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen waren von einer phagosomalen Membran umgeben. Diese Phagosomen wurden ebenfalls durch HRP schwarz gefärbt wie in Abb. 19 zu erkennen ist. Die Phagosomen mit *M. smegmatis* zeigen einen sehr kleinen intraphagosomalen Spalt, d.h. der Abstand von der phagosomalen Membran zur Bakterienzellwand ist sehr gering. Diese Art der Phagosomen ist typisch für Mykobakterien. Um nicht vollständig phagozytierte Mykobakterien liegt die Makrophagenmembran weniger eng (Abb. 19 Pfeile).





Abb. 19: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. smegmatis*-Zellen, die *tlyA*-exprimieren und von einem humanen Makrophagen phagozytiert wurden. Die Proben wurden nach 4 h fixiert. Endosomale Kompartimente sind durch HRP gefärbt. Die Pfeile zeigen auf eine Bakterienzelle, die noch nicht vollständig phagozytiert worden ist.

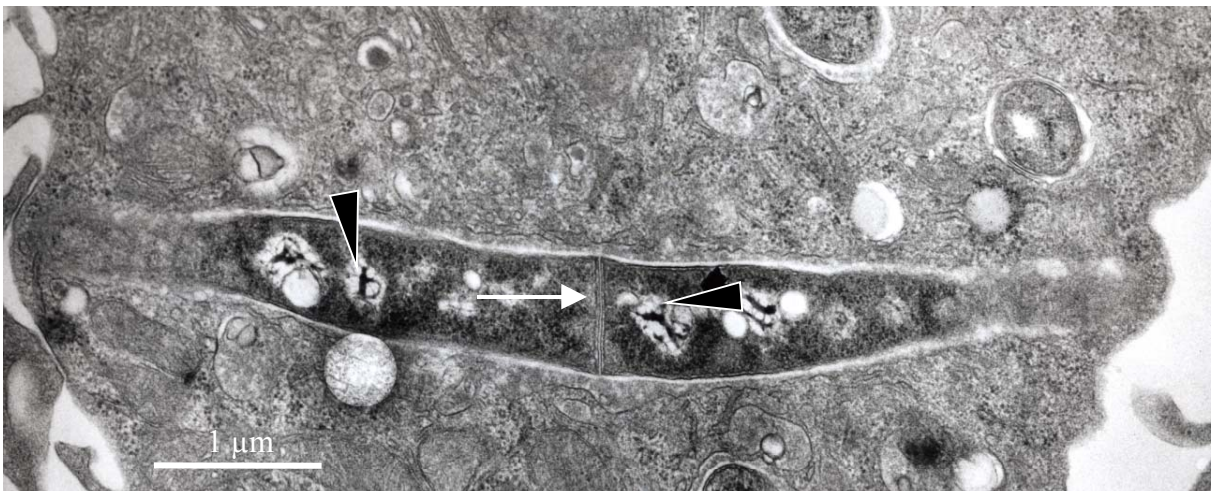


Abb. 20: Teilungsstadium einer *tlyA*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zelle in einem humanen Makrophagen 4 h nach Infektion. Ein Teilungsseptum (Pfeil) und zwei getrennte Chromosomen des Bakteriums sind zu erkennen (Pfeilspitze).

Nur sehr wenige Bakterienzellen zeigten Anzeichen von Degradation. Z.T. wurden intrazellulär Teilungsstadien der Bakterien festgestellt (Abb. 20 und Abb. 21). Wie in Abb. 21 und

Abb. 23 zu sehen, verbleiben auch *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen in Phagosomen und liegen nicht frei im Zytoplasma des Makrophagen vor.

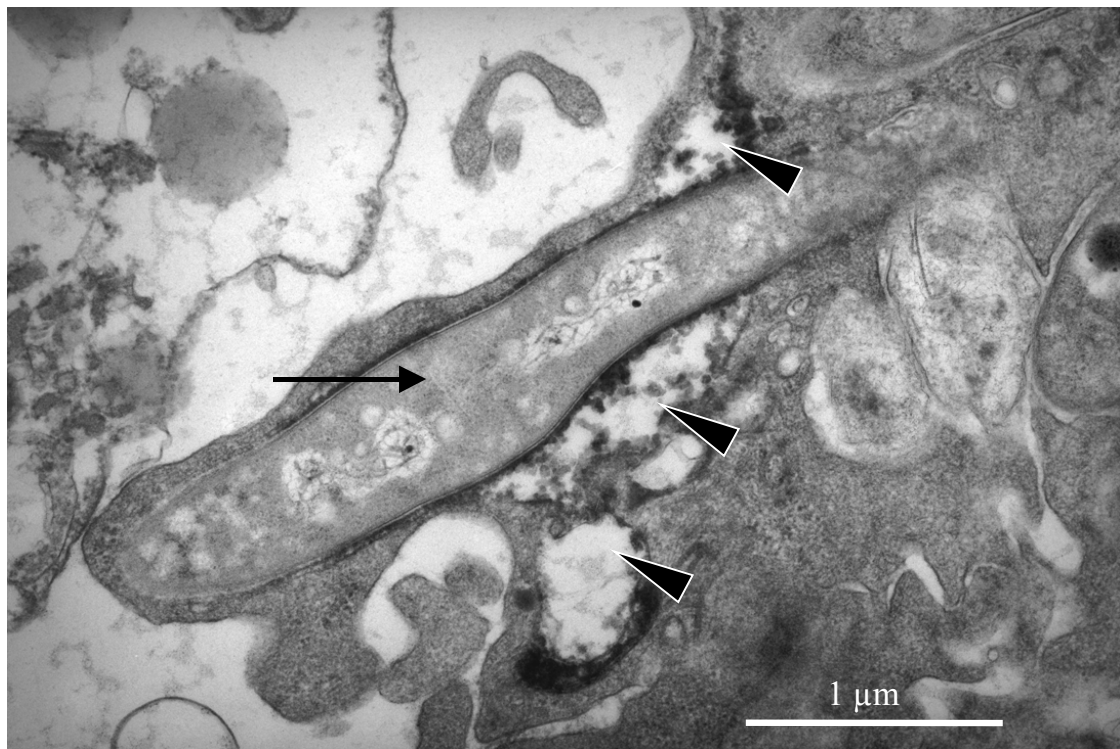


Abb. 21: 4 h nach der Infektion fixierte *M. smegmatis*-Zellen, die *hly*-exprimieren und von einem humanen Makrophagen phagozytiert wurden. Die Fusion zwischen einem frühen Endosom (*early endosome*) und dem Phagosom ist gut erkennbar. Das frühe Endosom ist durch Pfeilspitzen, ein Teilungsseptum in der Bakterienzelle durch einen Pfeil markiert.

Eine Fusion zwischen Phagosomen und frühen Endosomen konnte für Transformanten mit *hly*-Expression festgestellt werden (Abb. 21 und Abb. 22).



Abb. 22: Fusion zwischen einem Phagosom (Pfeilspitze), das ein *hly*-exprimierendes Bakterium trägt, und einem Endosom. Der Pfeilspitze markiert ein degradierte Bakterienzelle.

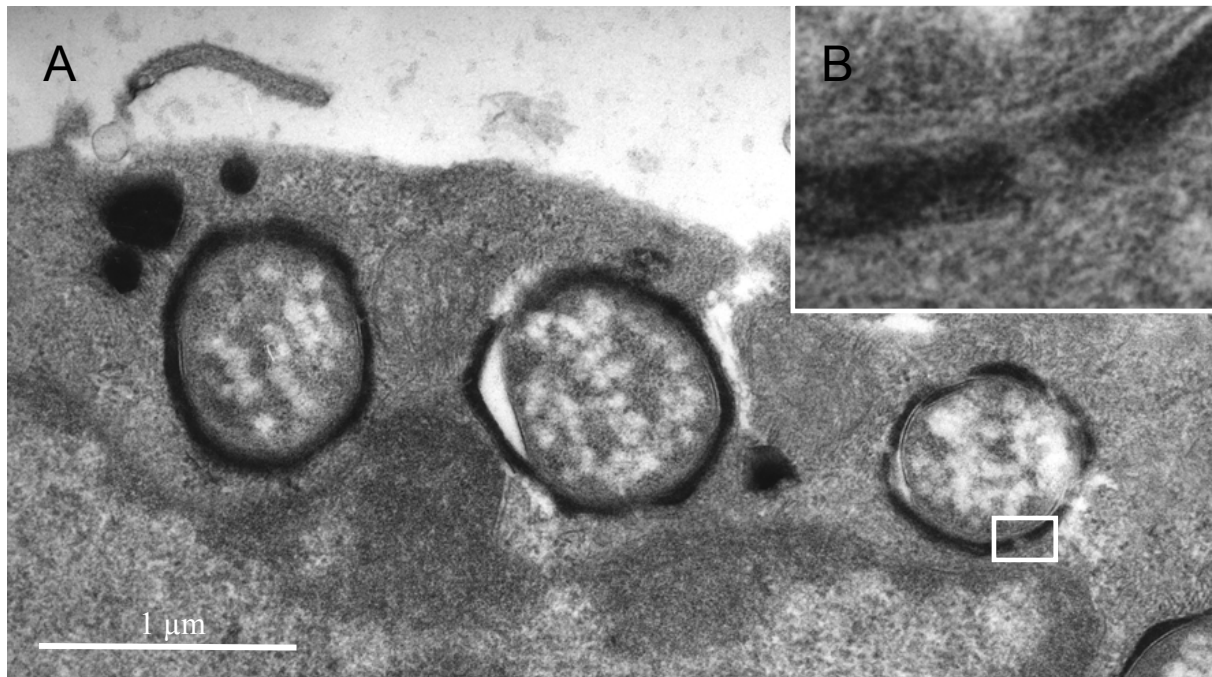
Auch Fusion zwischen Phagosomen und Lysosomen wurde für *hly*-exprimierende Transformatanten festgestellt (Abb. 22).



**Abb. 23:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. smegmatis:hly*. Die Proben wurden nach 4 h fixiert. Die Pfeile zeigen auf Blasen, die sich aus der phagosomalen Membran gebildet haben.

Obwohl keine Bakterien frei im Zytoplasma gefunden wurden, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Teile der phagosomalen Membran beschädigt sind (C. de Chastellier, pers. Mitt.). So war es nicht möglich in allen Phagosomen die phagosomale Membran vollständig zu erkennen. Bei *hly*-exprimierenden Zellen wurde Blasenbildung beobachtet, die sehr untypisch für mykobakterielle Phagosomen ist (C. de Chastellier, pers. Mitt.). Solche Blasen sind in Abb. 23 erkennbar und mit Pfeilen markiert.





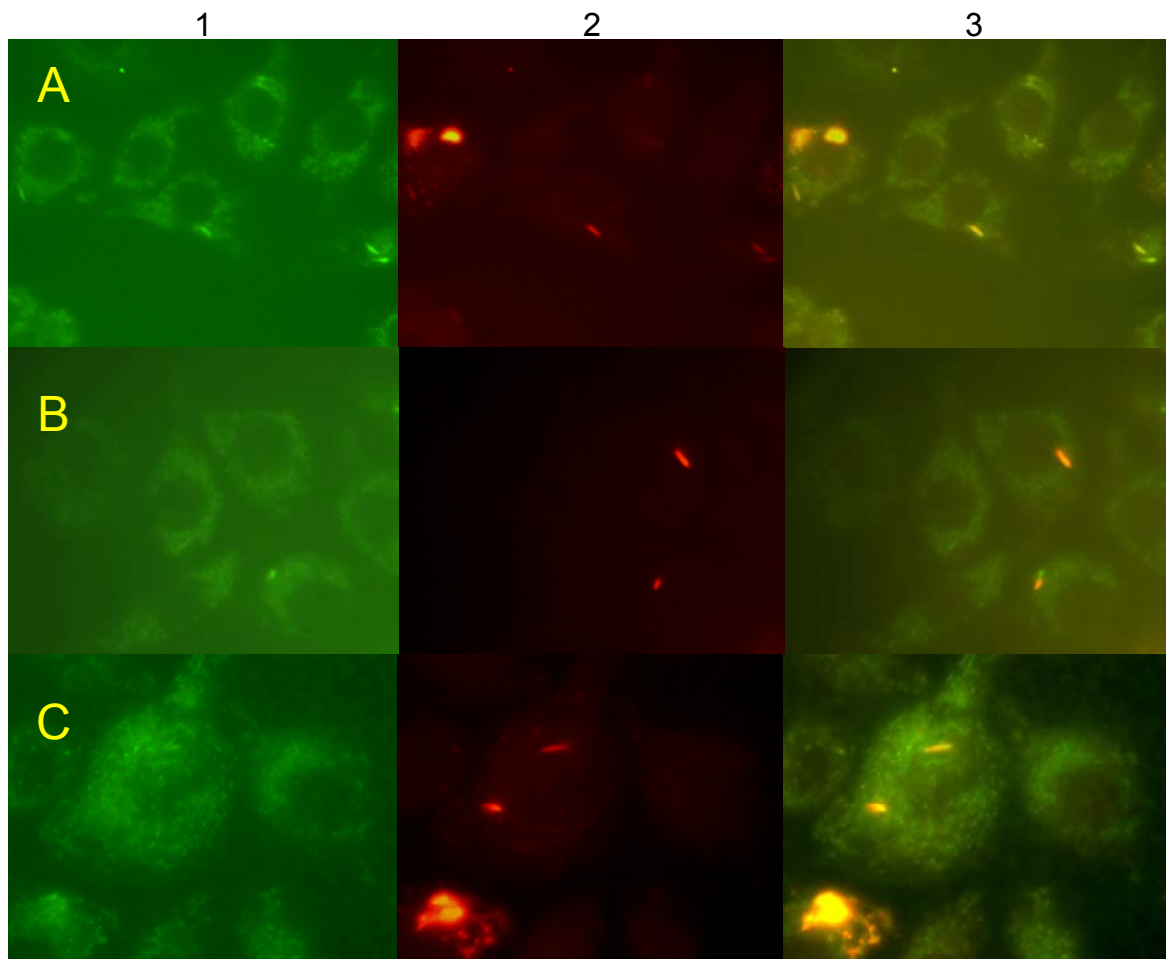
**Abb. 24:** Unterbrechungen im DAB-Niederschlag bei *hly*-exprimierenden *M. smegmatis* Phagosomen. (B) zeigt den Ausschnitt aus (A), der mit einem weißen Rahmen umgeben ist.

Neben einer Blasenbildung sind Unterbrechungen im HRP- abhängigen DAB-Niederschlag erkennbar (Abb. 24). Diese sind auf Phagosomen beschränkt, die *hly*-exprimierende Bakterien tragen.

### 3.6 Phagosomaler pH

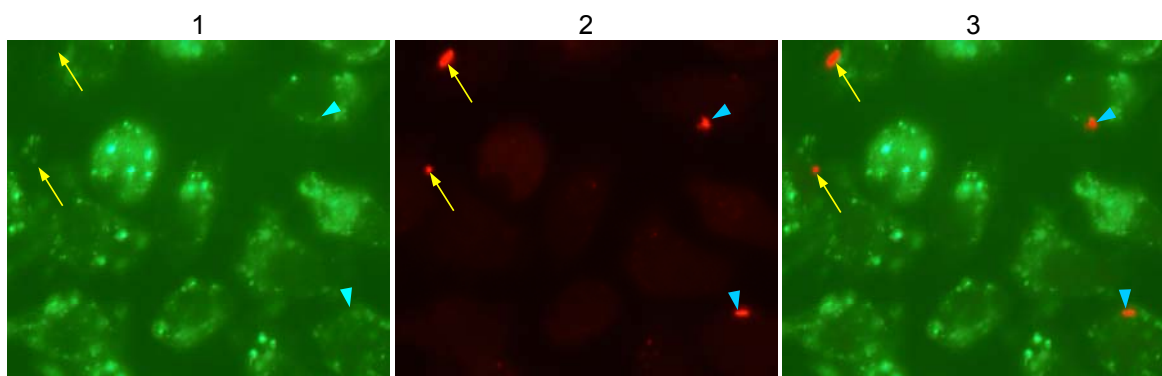
Das Phagosom von pathogenen Mykobakterien weist einen leicht verminderten pH-Wert auf, der bei einem Wert von 6,2 liegt (Crowle et al., 1991; Kuehn et al., 2001; Oh & Straubinger, 1996; Sturgill-Koszycki et al., 1994). Phagosomen, die *M. smegmatis* tragen, weisen hingegen einen pH-Wert auf, der deutlich unter 6 liegt (Kuehn et al., 2001). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression von *hly* und *tlyA* einen Einfluss auf den phagosomalen pH-Wert von *M. smegmatis* hat.

In Abb. 25 sind Ergebnisse von Kolo-kalisationsexperimenten mit Lyso-tracker wiedergeben. Die Anreicherung von nachweisbaren Mengen des Fluoreszenzfarbstoffes Lyso-tracker ist nur bei Phagosomen von *M. smegmatis*:pAT261 möglich. Bei *tlyA*- und *hly*-exprimierenden Bakterien ist keine oder nur eine schwache Kolo-kalisation feststellbar.



**Abb. 25:** Kolokalisation von Lysotracker und mit TRITC gefärbten Bakterien. In (A) sind *M. smegmatis*:pAT261-Zellen zu sehen, in (B) *M. smegmatis*:pAT:tlyA und in (C) *M. smegmatis*:pAT261:hly. Die Spalte, die mit 1 beschriftet ist, zeigt den grünen Kanal, die mit 2 den roten Kanal und mit 3 die Überlagerung der beiden Kanäle.

Durch Infektion von RAW 264.7 Zellen mit *M. bovis* BCG konnte gezeigt werden, dass Kolokalisation von Lysotracker und *M. bovis* BCG entweder gar nicht oder nur sehr undeutlich feststellbar ist (Abb. 26).

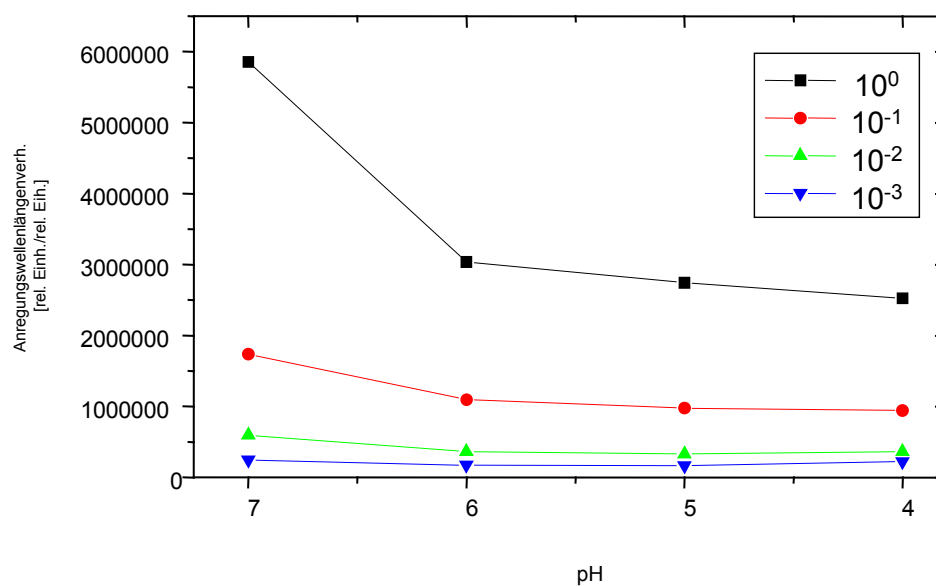


**Abb. 26:** Färbung der sauren Kompartimente von RAW 264.7 Zellen mit Lysotracker, die mit *M. bovis* BCG infiziert wurden. Bakterienzellen, die keine Kolokalisation ausweisen sind mit einem Pfeil markiert, Bakterien mit leichter Kolokalisation mit einer Pfeilspitze.



Die Anwendung von LysoTracker zur Bestimmung der Ansäuerung des Phagosoms zeigt ausschließlich qualitative Unterschiede, keine quantitativen. Deshalb wurde eine weitere Methode zur Bestimmung des phagosomalen pH-Wertes angewandt. Durch das gleichzeitige Anfärben der Oberflächenproteine mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein und Rhodamin lässt sich der phagosomale pH-Wert erfassen (Schlesinger, 1994).

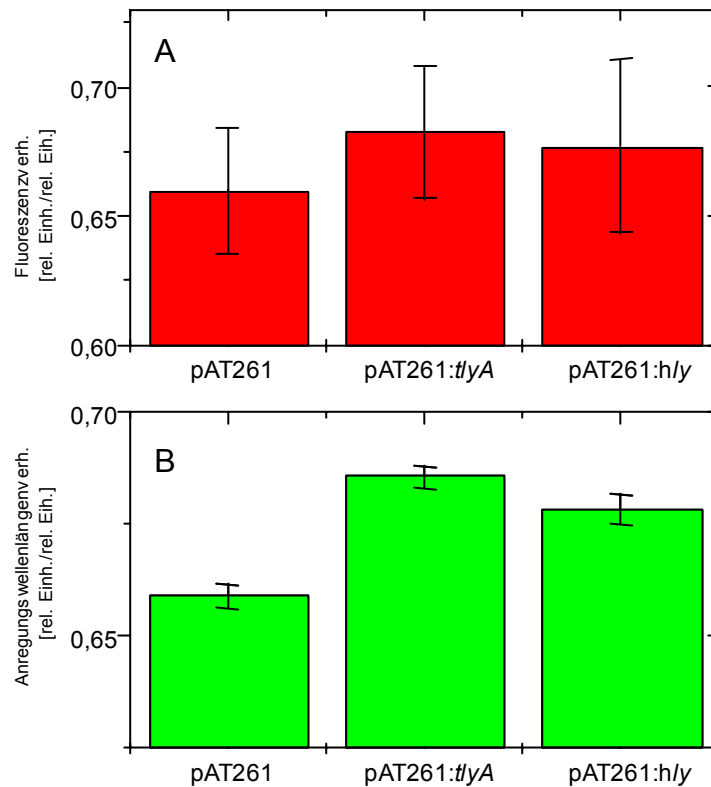
Sowohl die Verschiebung der Anregungswellenlänge von Fluorescein (Abb. 27) als auch das Fluorescein-Rhodamin-Verhältnis (Daten nicht gezeigt) sind nicht ausschließlich vom pH-Wert, sondern auch von der Bakteriendichte abhängig.



**Abb. 27:** Verschiebung der Anregungswellenlänge einer mit FITC markierten Bakteriensuspension in Abhängigkeit des pH-Werts und der Bakteriendichte. Die Bakteriensuspension wurde in 10er Schritten verdünnt.

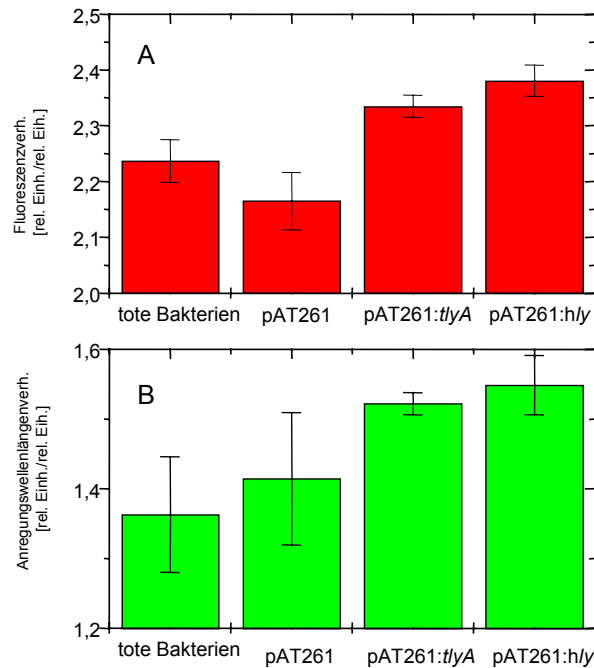
Aus diesem Grund wurde bei allen folgenden Experiment darauf geachtet, dass die Bakteriendichte aller drei *M. smegmatis*-Transformanten gleich war.

Wie in Abb. 28 dargestellt, ist sowohl das Verhältnis von Fluorescein- zu Rhodamin-bedingter Fluoreszenz als auch das Verhältnis von bei 490 nm angeregter Fluorescein-Fluoreszenz zu 450 nm angeregter Fluoreszenz niedriger bei mit *M. smegmatis*:pAT261 Transformanten als bei *tlyA*- oder *hly*-exprimierenden *M. smegmatis* Zellen.



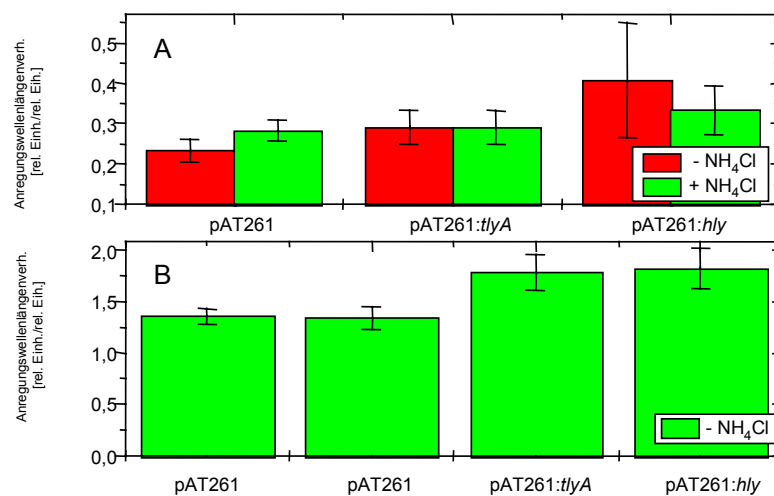
**Abb. 28:** Verhältnis von Rhodamin-bedingter zu Fluorescein-bedingter Fluoreszenz der Bakterien 4 h nach Infektion von RAW 264.7 Zellen (A). Anregungswellenlängenverschiebung des Fluoresceins von 490 nm zu 450 nm für identische Kulturen (B).

Das Experiment wurde wiederholt mit Fluoreszenzfarbstoffen, die eine andere reaktive Gruppe aufweisen. Dabei handelte es sich um Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) und Carboxyrhodamin-Succinimidylester (CRSE). Zusätzlich wurden mit durch UV-Licht abgetöteten *M. smegmatis*-Zellen infiziert. Wie in Abb. 29 dargestellt, zeigt sich eine zum ersten Versuch vergleichbare Tendenz für lebende *M. smegmatis*-Transformanten. Tote *M. smegmatis*-Zellen liegen beim CFSE-/CRSE-Verhältnis zwischen *hly* und *tlyA*-exprimierenden Zellen und pAT261-Transformanten. Beim CFSE-Anregungsverhältnis liegen sie auf gleichem Niveau mit *M. smegmatis*:pAT261 Zellen. Man kann somit von einer Ansäuerung des Phagosoms lebender *M. smegmatis*:pAT261 und toter Bakterien ausgehen.



**Abb. 29:** Verhältnis der CFSE zu CRSE Fluoreszenz (A) und Verhältnis der Anregungswellenlänge von CFSE (B). Zusätzlicher wurde mit von durch UV-Licht abgetöteten Bakterien infiziert. Messung erfolgte wieder 4 h nach Infektion.

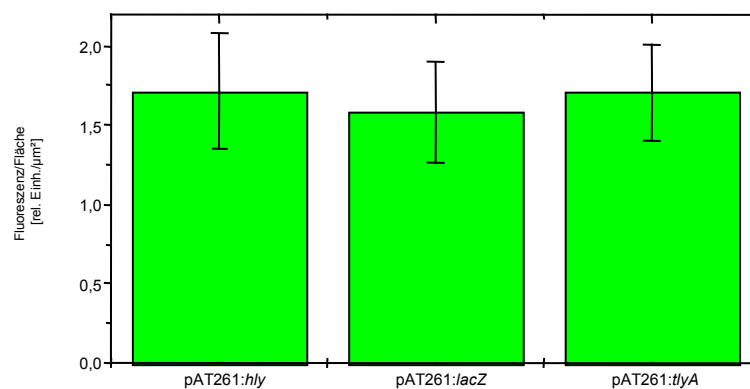
Um einen Anhaltspunkt für die Streuung des phagosomalen pH-Wertes von pAT261-Transformanten zu erhalten, wurde der Versuch mit zwei Populationen wiederholt, die getrennt voneinander gewachsen waren und mit denen separat infiziert wurde. In einem anderen Ansatz wurde die RAW 264.7 Kultur 3 h nach Infektion für 1 h mit 30 mM Ammoniumchlorid inkubiert.



**Abb. 30:** Fluorimetrische Messung des phagosomalen pH-Wertes von infizierten RAW 264.7-Zellen. In (A) sind die Verhältnisse der Anregungswellenlängen von *M. smegmatis*-Klonen, die mit den Plasmiden pAT261, pAT261:tlyA und pAT261:hly transformiert wurden, mit und ohne Zugabe von 30 mM Ammoniumchlorid für 1 h verglichen. In (B) sind zwei getrennte Ansätze von *M. smegmatis*:pAT261-Zellen mit tlyA- und hly-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen verglichen.

Wie aus Abb. 30 B zu entnehmen ist, verhalten sich pAT261-Transformanten, die auf getrennten Nährboden gewachsen sind, annähernd gleich und signifikant anders als *M. smegmatis* Zellen, die *tlyA*- oder *hly*-exprimieren. Durch die Zugabe von Ammoniumchlorid konnte gezeigt werden, dass erstens die Verschiebung der Anregungswellenlänge reversibel ist und zweitens, dass diese Verschiebung der Anregungswellenlängen auf eine Änderung des pH-Wertes zurückzuführen ist (Abb. 30 A). Nach Zugabe von Ammoniumchlorid stieg das Anregungswellenlängenverhältnis bei pAT261-Transformanten auf eine zu *tlyA*-exprimierenden Transformanten vergleichbares Niveau.

Unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops konnte das CFSE/CRSE-Verhältnis für einzelne Bakterienzellen bestimmt werden. Dadurch wurde der Fehler vermieden, der durch Unterschiede in der Bakteriendichte entsteht. Außerdem ist es auf diese Weise möglich zwischen Phagosomen, die eine Bakterienzelle oder mehrere Bakterien enthalten, zu unterscheiden. Ein Nachteil der fluoreszenzmikroskopischen Erfassung des phagosomalen pH-Wertes ist, dass nur verhältnismäßig wenige Zellen untersucht werden können, so dass eine größere Streuung der Werte möglich ist.

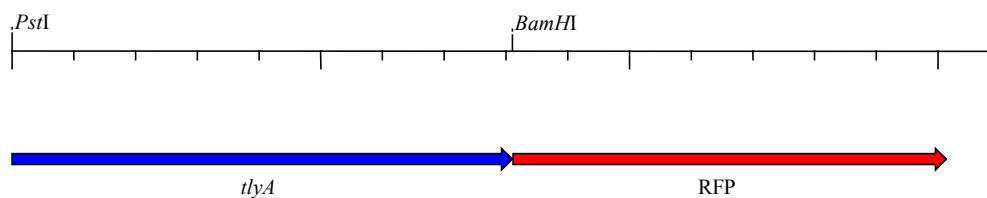


**Abb. 31:** Verhältnis der Fluoreszenzstärke von CFSE und CRSE. Die Fluoreszenzstärke wurde 4 h nach Infektion von RAW 264.7 Zellen mittels eines Axioskop 2 mit AxioCamHRc Kamera gemessen.

In Abb. 31 sind die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen erlangten Messung der CFSE/CRSE-Verhältnisse dargestellt. *tlyA* und *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen lassen ein sehr ähnliches Verhältnis erkennen. *M. smegmatis*:pAT261 Zellen hingegen zeigen einen niedrigeren Wert. Die Unterschiede im CFSE/CRSE-Verhältnisse sind aber nicht signifikant, wie anhand der großen Streuung deutlich wird.

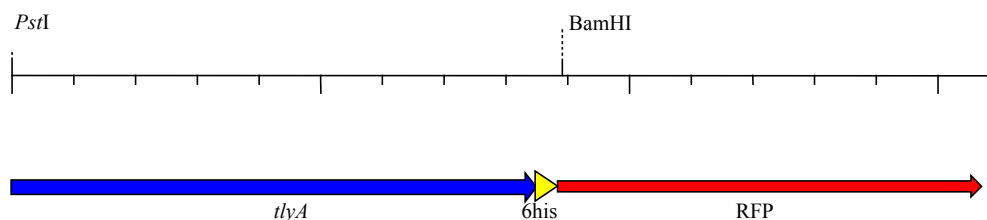
### 3.7 TlyA Fusionsprotein

Um die intrazelluläre Lokalisation von TlyA zu untersuchen, wurde eine Genfusion zwischen *tlyA* und RFP hergestellt. Dafür wurde das RFP tragende Fragment des Vektors pDsRed1-1 über einen *Pst*I- und *Spe*I-Verdau isoliert und in den Vektor pAT261, der mit *Pst*I und *Nhe*I geöffnet wurde, inseriert. Der neue Vektor pAT261RFP trägt kein *hly* mehr, da es durch den *Pst*I-Verdau deletiert wurde. *tlyA* wurde über PCR mit den Oligonukleotiden ‚fw TlyRFP‘ und ‚rev Tly-RFP‘ amplifiziert und mit *Pst*I und *Bam*HI verdaut. Das PCR Fragment wurde in den Vektor pAT261RFP, der mit den gleichen Endonukleasen geschnitten wurde, eingefügt. Die Klonierung des PCR-Produktes wurde mittels mehrfacher Sequenzierung überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Leseraster von *tlyA* in das Leseraster vom RFP übergeht.



**Abb. 32: Konstruktion der Genfusion von *tlyA* und RFP.**

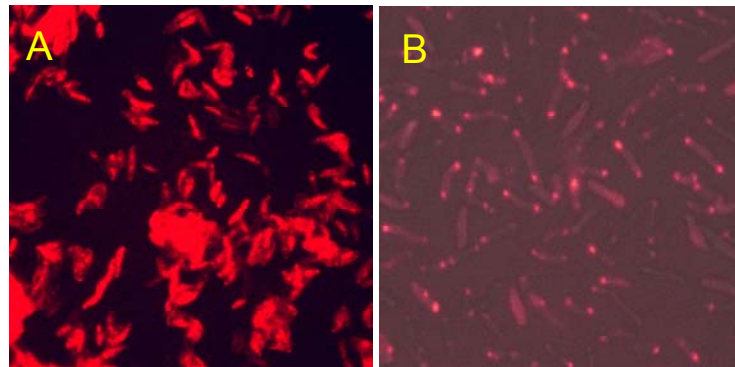
Um das Genprodukt im Westernblot nachweisen zu können, wurde über ein Verbindungsstück in das Leseraster 6 Histidine eingefügt. Dafür wurde der Vektor mit *Bam*HI geöffnet und das aus den beiden Oligonukleotiden ‚Link ThisRfp fw‘ und ‚Link ThisRfp rv‘ bestehende Verbindungsstück inseriert. Auch diese Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft. Der neu entstandene Vektor wird pT-R6his genannt.



**Abb. 33: Insertion einer Sequenz, die 6 Histidine kodiert, zwischen *tlyA* und RFP.**

*M. smegmatis*-Transformanten mit dem Vektor pT-R6his zeigen eine deutliche rote Fluoreszenz bei entsprechender Anregung (Abb. 34 A). In älteren Kulturen weisen die Zellen diese Fluoreszenz nur an den Zellpolen auf (Abb. 34 B). Es konnte nicht eindeutig gezeigt werden,

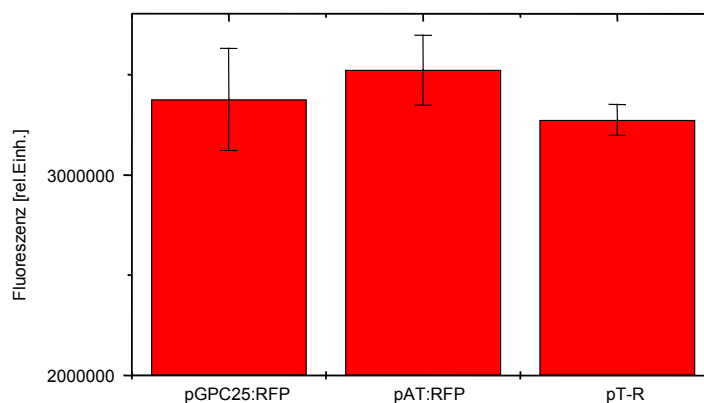
ob es sich um einen kausalen Zusammenhang, der auf die Fusion mit *tlyA* zurückzuführen ist, oder um einen Artefakt durch das Alter der Kultur handelte.



**Abb. 34:** *M. smegmatis*:pT-R6his-Transformanten in der späten logarithmischen Wachstumsphase (A) und in der Stationärenphase (B). (A) zeigte eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, (B) eine lasermikroskopische.

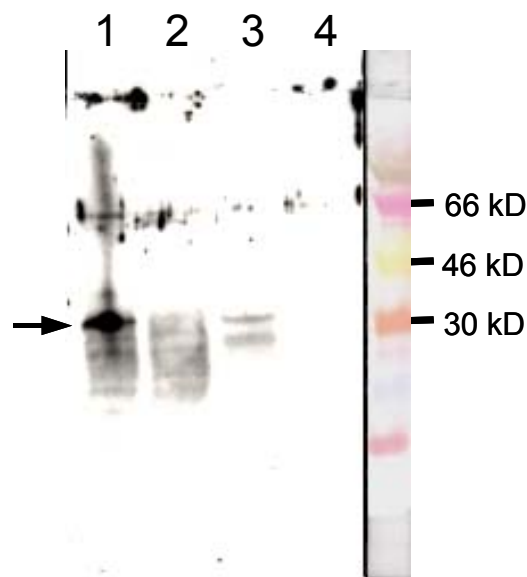
Durch Untersuchungen der Lokalisation des TlyA können Rückschlüsse auf deren Funktion gezogen werden. Insbesondere kann ausgeschlossen werden, dass es sich um ein regulatorisches Protein handelt, welches die Transkription eines Hämolytins steuert. Dies ist z.B. im Fall des *slyA* aus *Salmonella typhimurium*, das die Expression des Hämolytins *sheA* in *E. coli* K-12 aktiviert, selber aber nicht hämolytisch ist, beschrieben worden (Ludwig et al., 1995).

Um die Lokalisation des TlyA zu untersuchen wurden zwei unterschiedliche Verfahren gewählt. Zum einen wurde der Kulturüberstand von den Transformanten, die den Vektor pAT:RFP tragen und RFP-exprimieren, mit dem von Transformanten, die den Vektor pT-R6his tragen und das Fusionsprotein *tlyA*-RFP-exprimieren, fluorimetrisch verglichen. Es wurde keine erhöhte Fluoreszenz bei Transformanten mit dem Plasmid pT-R6his verglichen mit anderen RFP-exprimierenden Transformanten festgestellt (Abb. 35).



**Abb. 35:** Vergleich der Fluoreszenz des Kulturüberstands bei 560 nm Anregung und 572 Emission von *M. smegmatis*:pGPC25RFP, *M. smegmatis*:pATRFP und *M. smegmatis*:pT-R-Zellen.

Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass TlyA-RFP von *M. smegmatis* nicht sezerniert wird. Um zu überprüfen, ob TlyA ohne RFP sezerniert wird, wurde der Vektor pT-R6his mit *Bam*HI geschnitten und die überhängenden Enden mit T<sub>4</sub>-DNA-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde der Vektor mit sich selbst ligiert. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters. Die 6 Histidine liegen in diesen Vektor, der pT-R6hisT4 genannt wird, nicht mehr zwischen TlyA und RFP, sondern am C-terminalen Ende des *tlyA*. Für dieses neue Fusionsprotein wurde ein Westernblot durchgeführt. Die Fraktionen ‚Überstand‘, ‚Zellwand‘, ‚Zellmembran‘ und ‚Zytoplasma‘ wurden dabei getrennt untersucht.



**Abb. 36:** Westernblot gegen das Fusionsprotein *tlyA*6his mit dem AntiHis Antikörper (Qiagen) (M. Wolke, pers. Mitt.). 1: Zellwand, 2: Zellmembran, 3: Zytoplasma, 4: Überstand. Der Pfeil zeigt auf das spezifische Genprodukt in der erwarteten Größe. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Wie man in Abb. 36 erkennen kann, zeigt die Fraktion ‚Zellwand‘ das stärkste Signal. In der Zellmembran und im Kulturüberstand ist fast kein TlyA-Fusionsprotein nachweisbar. Im Zytoplasma ist eine geringe Konzentration des Proteins detektierbar. Man kann also davon ausgehen, dass es sich beim TlyA um ein Zellwandprotein handelt.

### 3.8 Vergleich der Aminosäuresequenz von TlyA verschiedener Arten

TlyA aus *M. tuberculosis* zeigt außer mit dem TlyA aus *M. leprae*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori* und *Synechocystis* sp. noch hohe Übereinstimmung zu den Gen-Produkten anderer Arten. Diese sind in Tab. 15 miteinander verglichen.

Tab. 15: Sequenzvergleich von TlyA aus verschiedenen Arten

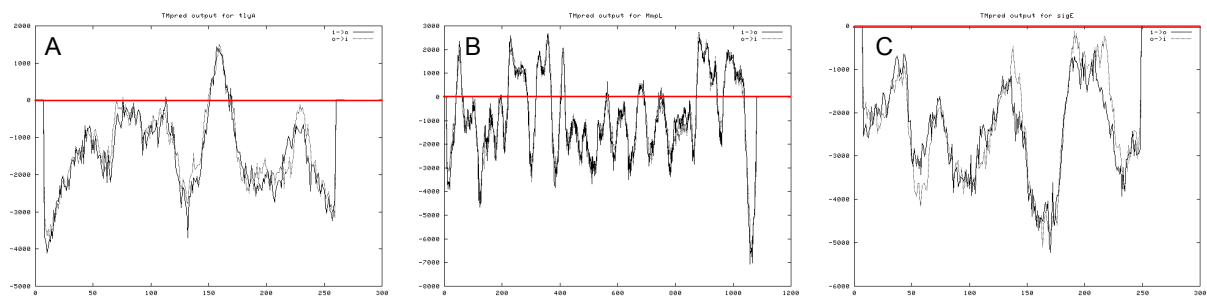
<i>M. leprae</i>	1	--MARRRVVDVLRGLARSRQQAALISAGKVSIDGLPAVKPSTAVAITTVLTVADD--
<i>M. ulcerans</i>	1	--MARRTRVDAELVRRGLARSRQQAELISAGKVRIDGLPAVKPATAVAAATAALTVAAD--
<i>M. tuberculosis</i>	1	--VARRARVDAELVRRGLARSRQQAELIGAGKVRIDGLPAVKPATAVSDTTALTVVTD--
<i>Streptomyces coelicolor</i>	1	MAGVARRRLDAELVRRKLARSREHASQLIAAGRVTVGKTATKPAQVETAAAIIVVTADD
<i>Nostoc sp.</i>	1	-----MTVNEQIIDKPKTEVDVAAQVKIKER--
<i>Thermotoga maritima</i>	1	--MADKKRLDQLVIERGLVESREKAKVLILACKVLVNGERVTKASKLVPEDANVELLEE--
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1	-----MRLDEYVHSEGYTESRSKAQDIILAGCVFVNGVKVTSKHKIKDNDNTEVVQN--
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1	---MTKIRLDEYLLQKGLVTDIATARSLLIQGKVHNKHEKLIKSIKVNHRHDPDIKVKLP--
<i>Rickettsia conorii</i>	1	---MTKIRLDEYLLQKGFVTDITARSLLIQGKVHNKHEQLIKPCIQVNNINDTEIKVKLP--
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1	-----MTLEKVLKMGFEKAESLIRTCYVKLNQTCYFPCQKISNLDSINIKKEK--
<i>Helicobacter pylori</i>	1	-----MRLDYALFSQLVNSREKAKALVLKNQVLVNMVSVSKPSFIVKENDKTELIAEK--
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	-----MRDFDFVSKRLNISRNKALELIENEEILNGKSFKASFVDVKNFLENKKTQDL--
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	1	-MKGFRNNILNIIICKRYPEKTRKELMILILKGNIVYNSHKEKNKILINKTSKIDLVEN--
<i>M. leprae</i>	58	G-----ERSVVSARGAHKLMGALDTFG---IPVAGRCCLDAGASTGGFTFV
<i>M. ulcerans</i>	58	S-----ERGVVSARGAHKLMGALDTFG---IDVHGRCCLDAGASTGGFTFV
<i>M. tuberculosis</i>	58	S-----ERAVVSARGAHKLVGALDTFG---IAGVGRCLDAGASTGGFTFV
<i>Streptomyces coelicolor</i>	61	N-----DPDYVSARGCHKLACALAAFPVPHGVVEGRALDAGASTGGFTDV
<i>Nostoc sp.</i>	27	-----SREVSARGGEKILAKGLELFA---ISVNGRVCLDGGISTGGFTDC
<i>Thermotoga maritima</i>	58	-----PKYVSARGCYKLESAPFSEK---IDVSGKVACDAGASTGGFTDF
<i>Borrelia burgdorferi</i>	54	-----IKYVSRAACEKLEKAFVBEF---ISVENKICLDAGASTGGFTDF
<i>Rickettsia prowazekii</i>	58	-----QHNYSVARGALKLITADYEFK---IDPQNLVCLDGSSTGGFTFV
<i>Rickettsia conorii</i>	58	-----QHNYSVARGALKLITADYEFK---IDPENLVCLDGSSTGGFTFV
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	50	-----QKYVSARGALKLOAYDYEFK---INFQDKIILDGASKGGFTQF
<i>Helicobacter pylori</i>	55	-----LEVSRACEKLGAFLETHF---VDFKGVCLDVGASKGGFSQV
<i>Campylobacter jejuni</i>	54	NPEDILLANELKLDLSEIYVSRAALKKKFLBEND---IEIKHENCLDGSSTGGFVQH
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	59	-----TCQTEVSARGCYKLEALKDFE---IEVKNKICVDVGSSTGGFTDC
<i>M. leprae</i>	100	LLDRGAAEVVAADVGYGQLAWSVRCDPRVIVVERTNVHDLSPELIGG-----PVDLVVAD
<i>M. ulcerans</i>	100	LLDRGAAEVVAADVGYGQLAWSLRDPRVIVERTNVHDLSPAALIGG-----QVDLVVAD
<i>M. tuberculosis</i>	100	LLDRGAAEVVAADVGYGQLAWSLRNDPRVIVERTNARGLTPEALIGG-----RVDLVVAD
<i>Streptomyces coelicolor</i>	106	LLRAGAAHVVAADVGYGQLAWSLRQDERVIVKDRTNVRELTPAALDGE-----PVDLVVGD
<i>Nostoc sp.</i>	67	LLQAGAKLVYGIDVGYGQTDWGLRNPPQVILRETNLRQLQPKDIFYGDDG-AIPLAVVD
<i>Thermotoga maritima</i>	98	LLQAGAKVVAADVGYGQDHWKLRNDPRVIVMEKVNARYLNPDLLGEKVD-----VVTCD
<i>Borrelia burgdorferi</i>	94	LLKHGAKVVAADVGHNQVYKLRNDNRVVSIEDENAKDINKEMFNDEIPS----VIVSD
<i>Rickettsia prowazekii</i>	99	LFERKAEILFAVDVGYGELHSHKLRFPQKVKLEKTNARYLTDKQITTKP-----DLIVCD
<i>Rickettsia conorii</i>	99	LLERKAKLFAVDVGYGELHSHKLRDNPVHKVLEKTNARYLTDKQITTKP-----DLIVCD
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	90	CLEKGAKEVVAIDSGTNQDLYSLRINPKVCVKEKTNIKFVDSKSFND-----EIDLIVCD
<i>Helicobacter pylori</i>	94	ALLKGAKEVLCVDVGMQMDSESLKODKRECYEEDIRGFKTPTETID-----LALCD
<i>Campylobacter jejuni</i>	111	LLBNQALKITADVGSNQHPSLRVNEKILHENTDLRAFKSEEKFE-----LVTCD
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	101	LLQCGANFVYSIDVGINQLSYKLRIDPRVKVLERTNIFDVEFKIVPN-----FAVVD
<i>M. leprae</i>	155	LSFISLATVLSAAGCALPSADIVPMVKPQFEVKGQVGGG-VVRDLRLRADSVLAVAR
<i>M. ulcerans</i>	155	LSFISLTTVLPAAACALPHADIVPMVKPQFEVKGQVGGG-VVQDPALRAGAVLSVAR
<i>M. tuberculosis</i>	155	LSFISLATVLPALVGCASRDADIVLVKVPQFEVKGQVGGG-VVHDEQLRAERSVLAVAR
<i>Streptomyces coelicolor</i>	162	LSFIPLAVLPALVRCSTRPGADIVMMVKPQFEVKGKRGSGG-VVRSQAQLRAEAVRGVAR
<i>Nostoc sp.</i>	126	VSFISLTKILPALVQLTQPPREAVLLVKVPQFEVKGSRVKGKG-VVRDEPHQADALFQVWQ
<i>Thermotoga maritima</i>	153	VSFISLKKIIPALSRILKNIGDAVLLVKPQFEAPKFKVKGK-IVKDPGVHLEVLEIRK
<i>Borrelia burgdorferi</i>	150	VSFISITKTIPIIFRKLNNLEFVWTLIKPQFEAEKGDVSKGG-IIRDDILREKILNNAIS
<i>Rickettsia prowazekii</i>	154	ASFISLTTILPTPLNLAKEDCILALIKPQFEVKKNEVENGG-IITNPLLHQKVCDDKIKN
<i>Rickettsia conorii</i>	154	ASFISLTTILPTPLNLVKEDCMLIALIKPQFEVEKHEVEQGG-VIKNPLLHQKVCDDKIKD
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	145	VSFISLKKVILVKNLLTQGNKNTLLIKPQFEANSKYVQKC---GIVPKLYHKFLINRII
<i>Helicobacter pylori</i>	146	VSFISLYYLEALPLS---DEFILFKPQFEVGRGIKRNKK-GVVVDKEAILNALNENK
<i>Campylobacter jejuni</i>	163	VSFISLINLILYYIDNALK-EIILFKPQFEVGNIKRDKKGVLRDKAILKARDFEK
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	154	VSRSSISICVNLIDKLSDN-FIIVLILKPQFEFKSLN-DIKNFNGVVSGEYLKIIILQSVI
<i>M. leprae</i>	214	RATELG-IRTMDEVASSPGLSG-NVEYFLWLRAQTDLLESTDGLAAVQRAIAEGPQ--
<i>M. ulcerans</i>	214	RAGELG-IRTVGVATASPLPGPSC-NVEYFLWLRAQTDRPLSDDTLSDAIQTAVAEGPGRE
<i>M. tuberculosis</i>	214	RAQELG-IRHVGKASPLPGPSC-NVEYFLWLRTQTDRLASAKGLEDVHRAISEGP---
<i>Streptomyces coelicolor</i>	221	KAWELG-LGVKGVATASPLPGPSC-NVEYFLWLRLAG-----AGELDPADVDRVAEGPR--
<i>Nostoc sp.</i>	185	AAEKLK-IRYKGLTWSPITGPAG-NIEYLLWLNMESEMPPTDLNAIQQVTKSAMTDLGNS
<i>Thermotoga maritima</i>	211	SLIENG-IRVKKCCFSKIKCTEG-NIEYFVWVKEGENAIDLKIVEEAWRFFGERER-
<i>Borrelia burgdorferi</i>	209	KIIDCG-IRKEVNRTISPIKCAKGNIEYLAHFII-----
<i>Rickettsia prowazekii</i>	213	WLEQEHGQIFGLIASPIIGTKG-NKEFLICGRNMPISL-----
<i>Rickettsia conorii</i>	213	WLEKEHNGQIFGLIASPIIGCAKGNQEFLLCGKRKTILFL-----
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	202	EFAKPS-IRFNLNFPSPKICQKSKNPEYFSEY-----
<i>Helicobacter pylori</i>	202	NHLKTKDQILKIQESLVKCKNG-NVEYFTHFKRA-----
<i>Campylobacter jejuni</i>	221	ACAKLG-IRLKNQTKSSIKCKEG-NVEYFYIYIKN-----
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	213	EKFYKNLQVKKILKLTCKKKS-NQEFMFLVVKSSVLRIASSMQLLSNIEF-----

Beim Sequenzvergleich der verschiedenen Gen-Produkte zeigen sich Abschnitte, die hochkonserviert sind. Zwischen Listeriolysin und TlyA hingegen besteht keine signifikante Se-



quenzübereinstimmung. Auch zwischen den Phospholipasen C aus *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes*, *S. coelicolor* und dem TlyA aus *M. tuberculosis* wurden keine signifikanten Übereinstimmungen gefunden. Es gibt keine Anhaltspunkt für dafür, dass es sich beim TlyA um eine Phospholipase C handelt. Es wurde auch keine Sequenzübereinstimmung zu den Porinen MspA und MspD aus *M. smegmatis* gefunden.

Computeranalysen mit zwei unterschiedlichen Programmen zeigten eine mögliche Transmembrandomäne mit einer vergleichsweise hohen Wahrscheinlichkeit. In Abb. 37 sind die Wahrscheinlichkeiten für eine Transmembrandomäne für TlyA, ein Membranprotein der MmpL-Familie und für den Sigmafaktor E dargestellt. Wie erkennbar ist, zeigt der Sigmafaktor E keine positive Wahrscheinlichkeit für eine Transmembrandomäne. Für das Membranprotein der MmpL-Familie und für TlyA wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein bzw. mehrere Transmembrandomänen gefunden.



**Abb. 37: Wahrscheinlichkeit einer Transmembrandomäne von verschiedenen Proteinen aus *M. tuberculosis*. (A): TlyA, (B): MmpL und (C): SigE.**

Eine Transmembrandomäne wurde sowohl von dem Programm ‚SOSUI‘ als auch von dem Programm ‚TMpred‘ identifiziert und lautet: VVADLSFISLATVLPALV.



### 3.9 Anwendung des Listeriolysin bedingten Überlebensvorteils zur Identifizierung von phagosomal-induzierten Promotoren

Wie unter 3.2 dargestellt, bewirkt die Expression von *hly* in *M. smegmatis* eine erhöhte Überlebensrate in THP-1-Zellen. Diese Eigenschaft wurde benutzt um ein Promotor-Such-System aufzubauen, das auf einem promotorlosen *hly* als positivem Selektionsfaktor und dem Wildtyp-Allel des *rpsL* als negativen Selektionsfaktor beruht.

#### 3.9.1 Herstellung eines Streptomycin resistenten *M. smegmatis*-Stamms

Um gegen die Expression des Wildtyp Allels vom *rpsL* selektieren zu können, muss der verwendete *M. smegmatis*-Stamm im Genom ein mutiertes *rpsL* Allel tragen (Kenney & Churchward, 1994; Sander et al., 1995). Einen entsprechenden Stamm wurde durch Ausplattieren von *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155-Zellen auf LB-Platten, die mit 25 µg/ml Streptomycin supplementiert waren, hergestellt. Kolonien dieser Platten wurden auf LB-Platten mit 50, 100, und schließlich 1000 µg/ml Streptomycin sukzessiv übertragen. Der resultierende Stamm wurde S1000 genannt. Durch Transformation mit dem Plasmid pMV261-rpsL<sup>+</sup> wurden die Zellen wieder sensitiv gegen Streptomycin.

#### 3.9.2 Konstruktion des Vektors pTRAP und Testen seiner Komponenten

Als Ausgangsvektor wurde der von Hess et al. (1998) beschriebene Vektor pAT 261:*hly* gewählt, da dieser die Expression und Sekretion von Listeriolysin in Mykobakterien ermöglicht. Dieses Plasmid musste in mehreren Klonierungsschritten verändert werden. So war es für diese Untersuchungen unumgänglich, dass die promotorlosen Gene *lacZ* und *rpsL* inseriert wurden und dass keine Promotoraktivität stromaufwärts dieser Gene mehr erkennbar war.

##### 3.9.2.1 Einführung einer *SwaI*-Schnittstelle zwischen HSP60-Promotor und *hly*

Um den vom *hly* stromaufwärts gelegenen HSP60-Promoter deletieren zu können und statt dessen für die Klonierung genomischer DNA-Fragmente geeignete Schnittstellen einzufügen, musste die *NcoI*-Schnittstelle vor der Sequenz vom Alphaantigen ersetzt werden. Dies wurde dadurch erreicht, dass das *hly*-Fragment durch einen *PstI*-Verdau entfernt und in die *NcoI*-Schnittstelle des verbleibenden Vektors synthetische DNA inseriert wurde, die eine *SwaI*-Schnittstelle trägt. Für die Herstellung dieser synthetischen DNA wurden das Oligonukleotid

‚LinkerNcoI->SwaI’ verwendet. In den auf diese Weise neu entstandenen Vektor wurde das *hly*-Fragment wieder in die *PstI*-Schnittstelle inseriert. Dieser Vektor wird pTRAP1 genannt.

### 3.9.2.2 Einführung des Reporter-Genes *lacZ*

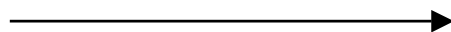
Um die transkriptionelle Aktivität stromaufwärts vom *hly* quantifizieren zu können, wurde das Reporter-Gen *lacZ* stromabwärts des rekombinanten *hly* in den unter 3.9.2.1 beschriebenen Vektor pTRAP1 kloniert. Dafür wurde *lacZ* in mehreren Schritten umklont: Excision aus dem Vektor pFDY157 mit *NheI* und *HindIII*, Auffüllung der Enden mit Hilfe von T4-Polymerase und Insertion in die *EcoRV*-Schnittstelle des Vektors pBluescript KS. Von den beiden neu entstandenen Vektoren, die das *lacZ* in unterschiedlicher Orientierung tragen, wurde der Vektor mit der Orientierung stromabwärts des *lac*-Promotors mit *BamHI* und *SalI* verdaut und das so entstandene *lacZ*-Fragment wurde direktional in den mit *BclI* und *SalI* verdauten Vektor pAT:*hlySwaI* inseriert. Der so entstandene Vektor wird pTRAP2 genannt.

### 3.9.2.3 Insertion des negativen Selektionsfaktors

Um ein *rpsL*-Gen ohne intrinsische Promotoraktivität zu erhalten, wurden das *rpsL* tragende Fragment aus dem Vektor pMV261-*rpsL*<sup>+</sup> (Sander et al., 1995) mit *XbaI* und *EcoRI* ausgeschnitten und mit *TaqI* partialverdaut.

*TaqI* ist eine Endonuklease mit einer Erkennungssequenz von lediglich vier Basenpaaren, die mykobakterielle DNA im Mittel alle 100 bp schneidet. Innerhalb des *rpsL* liegen zwei *TaqI*-Schnittstellen. Eine weitere *TaqI*-Schnittstelle liegt zwei Basen vor dem Translationsstart (Abb. 40) und noch eine weitere liegt 295 Basen nach dem Translationsstop (Abb. 41).

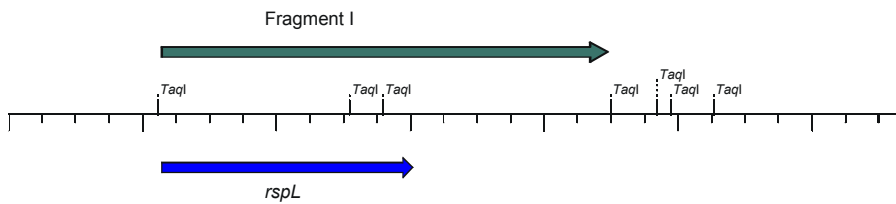
GAA**T**|CGAGT**T**TNAGGCAAGCTATGCGACACNCCCGAC



*TaqI*    *rpsL*

**Abb. 40:** Translationsstart des *rpsL* und *TaqI*-Schnitt stromaufwärts davon.

Mit Hilfe eines *TaqI*-Partialverdaues war es möglich das in Abb. 41 als ‚Fragment I’ bezeichnete DNA Stück zu isolieren.



**Abb. 41:** Restriktionskarte von *rpsL* im Plasmid pMV261-*rpsL*+

Dieses Fragment wurde in die *Cla*I-Schnittstelle von pBluescript KS kloniert. Dabei entstanden zwei Plasmide, die jeweils das *rpsL* in unterschiedlicher Orientierung aufweisen. Das Plasmid, welches das *rpsL* in der Orientierung des *lac*-Promotors trägt, wird pBlue:*rpsL* genannt. Das Fragment dieses Plasmids wurde mittels *Hinc*II und *Hind*III ausgeschnitten und in den Vektor pMV261-*rpsL*+ in die Schnittstellen *Hind*III und *Pvu*II inseriert. Funktionelle Analysen des Vektors ergaben keine Verminderung der Transformationseffizienz auf LB-Platten, die mit Kanamycin und Streptomycin supplementiert sind. Aus diesem Grund wurde in die *Sal*I-Schnittstelle die Shine-Dalgarno-Sequenz des Alpha-Antigens 85b eingeführt. Dafür wurden die hybridisierten Oligonukleotide ‚Linker ff rT SD‘ und ‚Linker rw rT SD‘ verwendet. Das Produkt wurde in den Vektor pMV261-*rpsL*+ umklontiert (s.o.) und funktionell getestet. Nach Einführung der Shine-Dalgarno-Sequenz wurden keine *M. smegmatis*-Kolonien auf mit Streptomycin supplementierten Platten mehr beobachtet. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass das *rpsL*-Allel nach Einführung der synthetischen Shine-Dalgarno-Sequenz exprimiert wird.

Die *Bam*HI-Schnittstelle dieses Vektors wurde durch eine *Bgl*II-Schnittstelle ersetzt. Das *rpsL* tragende Fragment mit *Bgl*II und *Sal*I direktional in den mit *Bam*HI und *Sal*I geöffneten Vektor pTRAP2 umklontiert. Der so entstandene Vektor heißt pTRAP3. *Bgl*II und *Bam*HI erzeugen kompatible DNA-Enden, so dass die ursprünglich im Vektor vorhandene *Bam*HI-Schnittstelle in pTRAP3 nicht mehr vorhanden ist.

Mit diesem Vektor transformierte *M. smegmatis*-Zellen exprimieren das Wildtyp-Allel vom *rpsL* unter der Kontrolle des HSP60-Promotors und sind deshalb gegen Streptomycin sensitiv.

#### 3.9.2.4 Einführung einer Klonierungsschnittstelle (cloning site)

In den Vektor pTRAP3 wurde ein synthetisches Verbindungsstück, das durch die Hybridisierung der Oligonukleotide ‚Link ff *Kpn*->*Swa*Bam*Pac*‘ und ‚Link rv *Kpn*->*Swa*Bam*Pac*‘ hervorging, in die Schnittstellen *Kpn*I und *Swa*I eingeführt. Der neu entstandene Vektor pTRAP4 trägt an dieser Stelle Schnittstellen für *Swa*I, *Bam*HI und *Pac*I. Die Schnittstelle *Bam*HI ist nur einmal im Vektor vorhanden und da *Bam*HI kompatible Enden zu *Sau*3A erzeugt, geeig-

net um randomisierte genomische DNA-Fragmente zu klonieren. *PacI* und *SwaI* schneiden im Genom von *M. avium* nicht und sind deshalb geeignet, um die isolierten genomischen DNA-Fragmente nach dem Screening directional umzuklonieren.

Durch die Insertion dieses Verbindungsstücks wurde der HSP60-Promotor aus dem Vektor pTRAP2 entfernt. Trotz Deletion dieses Promotors zeigen mit diesem Vektor transformierte *M. smegmatis*-Kolonien eine Blaufärbung auf x-gal-haltigen Platten. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass ein weiterer Promotor stromaufwärts des Verbindungsstücks im Bereich vom pAL5000-Ori liegt.

### 3.9.2.5 Terminatoren

Um eine Expression durch Plasmid-intrinsische Promotoren, die stromaufwärts des Verbindungsstücks gelegen sind, zu verhindern, wurden verschiedene Terminatoren vor die Klonierungsstelle inseriert. Dafür wurde der Vektor pTRAP3 bzw. pTRAP4 mit *SwaI* und *BamHI* geöffnet und die synthetischen DNA-Fragmente der hybridisierten Oligonukleotide ‚Term sinR ff‘ und ‚Term sinR rw‘ sowie ‚T4 ff‘ und ‚T4 rw‘ eingefügt.

**Tab. 16: Verwendete Terminatoren**

Terminator	Sequenz	Organismus
<i>sinR</i>	AGAGGAGTAGTGCCTGAGCAGAGGCACTAACTCCT CAGAGGAGTAGTGCCTGAGCAGAGGCACTAACTCC TCATTTAAATG	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Protoporphyrinogen IX Oxidase</i>	AAAACCTCCGCTTTATCGCGGAGGTTTT	<i>B. subtilis</i>
<i>WhiB3</i>	GCACAGAGACCCCTAT CAAATAGGGGTCTTTGT	<i>M. smegmatis</i>

Trotz der Verwendung der in Tab. 16 aufgeführten Terminatoren konnte die intrinsische Promotoraktivität mit der Polarität des Operons *hly*, *rpsL* und *lacZ* nicht soweit terminiert werden, dass keine Blaufärbung von *M. smegmatis*-Kolonien auf x-gal-Platten mehr feststellbar war.

Aus diesem Grund wurde die *EcoRI*-Schnittstelle stromabwärts des *lacZ* durch eine *KpnI*-Schnittstelle ersetzt. Dafür wurde das synthetische Verbindungsstück des Oligonukleotids ‚Link *EcoRI* zu *KpnI*‘ verwendet. Da sich eine weitere *EcoRI*-Schnittstellen auf dem Vektor befinden, war dies nur durch einen *EcoRI*-Partialverdau möglich. Der neue gewonnene Vektor pTRAP7 kann durch einen *KpnI*-Verdau in eine *hly-rpsL-lacZ*-Kassette und den verbleibenden Vektor getrennt werden. Nach erneuter Insertion der Kassette wurden Klone isoliert, die den Vektor mit der entgegengesetzten Orientierung der Kassette tragen. Dieser Vektor be-

wirkte keine Blaufärbung von *M. smegmatis*-Kolonien und wurde zur Klonierung der genomischen DNA-Bank verwendet. Er wird mit pTRAP bezeichnet.

### 3.9.3 Konstruktion und Durchsuchen der genomischen DNA-Banken mit dem Vektor pTRAP

Über einen *Sau3A*-Partialverdau wurde genomische DNA aus *M. smegmatis* so geschnitten, dass Fragmente mit einer Größe zwischen 200 und 1500 bp entstanden. Diese Größenfraktion wurde in Anlehnung an die genomische DNA-Bank aus *M. marinum* von Baker et al. (1998) gewählt. Die Transformation in XL-1 Blue *E. coli*-Zellen ergab eine Anzahl von  $2,8 \times 10^7$  Klonen. In *M. smegmatis* konnte mit dieser Bank eine Anzahl an Klonen von  $6,4 \times 10^4$  erreicht werden. Da beide Banken eine sehr hohe Repräsentanz aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass das gesamte *M. smegmatis*-Genom in der Bank wiedergegeben ist.



**Abb. 42:** Ausschnitt aus einer LB-Agarplatte mit *M. smegmatis*-Kolonien. Die Bakterienzellen wurden mit der genomischen DNA-Bank transformiert. Die Agarplatte ist mit x-gal supplementiert.

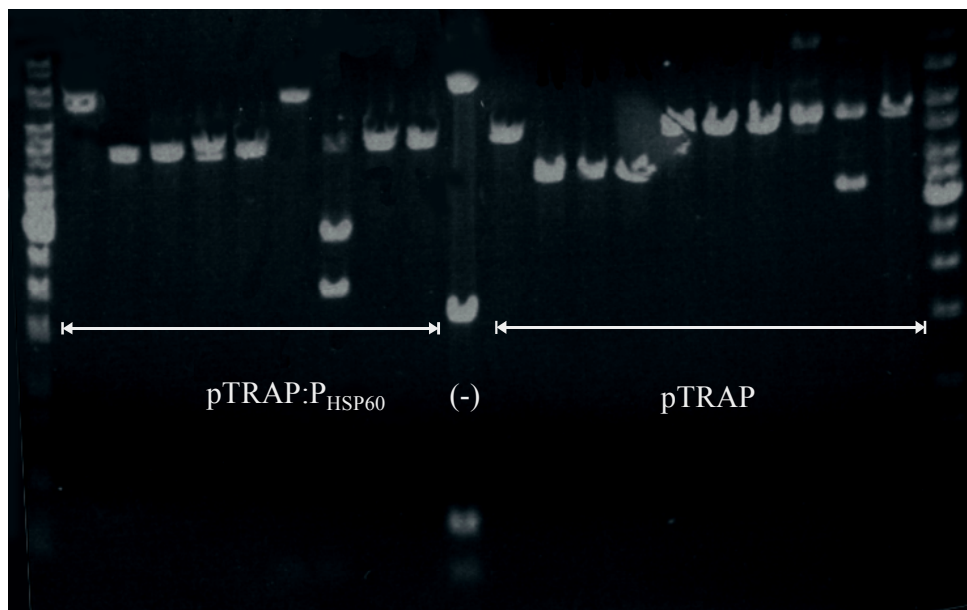
In Abb. 42 ist ein Ausschnitt aus einer mit x-gal supplementierten LB-Agarplatte dargestellt, die mit Transformanten der genomischen DNA-Bank beimpft wurde. Es zeigte sich ein Verhältnis von blauen zu weißen Kolonien von ungefähr eins zu drei.

### 3.9.4 Untersuchung der isolierten Klone

Die durch das Promotor-Such-System isolierten Klone wurden mit zwei Methoden auf Insertion genomischer DNA untersucht:

1. Es wurde eine Reisolierung der Plasmide (*plasmid rescue*) vorgenommen, d.h. die Plasmid-DNA wurde aus den Mykobakterien isoliert und damit *E. coli*-Zellen transformiert.

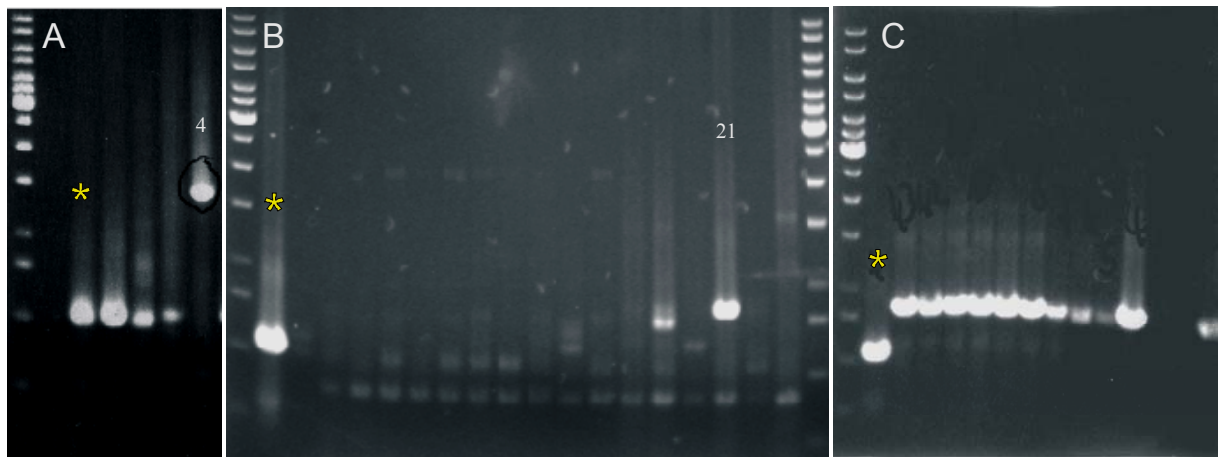
Die auf diese Weise gewonnenen Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung untersucht. Durch Plasmidreisolierung erhaltene Plasmide zeigen in vielen Fällen starke Abweichungen im Restriktionsmuster von dem Ausgangsplasmid. Alle reisolierten Plasmide waren kleiner als das Ausgangsplasmid (Daten nicht dargestellt). Es wurden deshalb *M. smegmatis* Klone, die den Ausgangsvektor pTRAP und einen Vektor mit Promotoraktivität auf Rekombination untersucht. Dafür wurde die *KpnI*-Schnittstelle durch eine zweite *SwaI*-Schnittstelle in dem Vektor pTRAP1 ausgetauscht. Dafür wurde das Oligonukleotid ‚Linker Kpni->SwaI‘ verwendet. Das Fragment, das den HSP60-Promotor trägt, wurde über einen *SwaI*-Verdau isoliert und in die *SwaI*-Schnittstelle des Vektors pTRAP inseriert. Der Vektor, der den HSP60-Promotor in Orientierung zum *hly* trägt, wird pTRAP:P<sub>HSP60</sub> genannt. *M. smegmatis*-Transformanten, die entweder den Vektor pTRAP oder den Vektor pTRAP:P<sub>HSP60</sub> trugen, wurden für 3 Tage inkubiert, die DNA isoliert und wieder in *E. coli* transformiert. Die auf diese Weise reisolierten Plasmide zeigen ein abweichendes Restriktionsmuster im Vergleich zu den Ausgangsvektoren (Abb. 43).



**Abb. 43:** Restriktionsvergleich von reisolierten Plasmiden, die mit *PstI* geschnitten wurden. Das Plasmid pTRAP, das direkt aus *E. coli* isoliert wurde, ist mit (-) gekennzeichnet.

2. Es wurde die Insertionsstelle aus den isolierten Klonen der genomischen DNA-Bank mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Dafür wurden die Oligonukleotide ‚ProTrapSense‘ und ‚ProTrapAntisense‘ verwendet. Über PCR amplifizierte Insertionsstellen zeigten in über 50% aller Fälle kein PCR-Produkt (Abb. 44 B).





**Abb. 44:** Agarosegel von PCR-Produkten aus Klonen der durchsuchten genomischen DNA-Bank. Die mit Sternchen markierten Fragmente zeigen auf das PCR-Produkt des Ausgangsvektors. Die PCR-Produkte der Klonen 4 und 21 sind entsprechend beschriftet. A: zeigt die Klonen des 6. Tages, B: die des 7. Tages, C: 8. Tages.

Klone, die am 8. Tag des Screenings isoliert wurden, zeigten in 70% der Fälle ein gleichgroßes PCR-Fragment. Alle isolierten Klone, bei denen eine Insertionssequenz über PCR nachweisbar war, tragen Promotoren, die auf LB-Agarplatten zur Expression von *lacZ* führen.

### 3.9.5 Untersuchung der isolierten Promotoren

Die beiden unterschiedlichen Insertionssequenzen, die durch das Promotor-Such-System isoliert werden konnten, wurden weiteren Untersuchungen unterzogen. Zum einen wurde die Sequenz mit der Sequenz bekannter Promotoren und mit Motiven bekannter Promotoren verglichen. Zum anderen wurde die Promotorstärke intra- und extrazellulär, sowie bei unterschiedlichen Mikromilieubedingungen gemessen.

#### 3.9.5.1 Sequenzanalyse

Die Sequenz der isolierten Fragmente wurde mit Hilfe der Oligonukleotide ‚ProTrapSense‘ und ‚ProTrapAntisense‘ bestimmt. Die ermittelte Nukleotidsequenz wurde mit bekannten Sequenzen durch einen Nukleotidvergleich am NCBI untersucht (*blast-search*).

Durch die Sequenzierung des PCR-Produktes des Vektors pTRAP, konnte sichergestellt werden, dass die für Klon 4 (Abb. 45) und Klon 21 (Abb. 46) angegebenen Sequenzen nicht vom Vektor pTRAP stammen.

```

Klon 4:          148 GAAGGGCAGGGTCTTGAGGTCTCTGCTGTGCACGCCACTGGAAGTGGACGAACCTCGTT 207
                  |||
NCBI-datenbank: 376 GAAGGGCAGGGTCTTGAGGTCTCTGCTGTGCACGCCACTGGAAGTGGACGAACCTCGTT 317

Klon 4:          208 GTCCACCGACACACCGAGCACCTTGGCGTCGCGGTCCTCGAAGTCCTCGTTCAGCTTGCC 267
                  |||
NCBI-datenbank: 316 GTCCACCGACACACCGAGCACCTTGGCGTCGCGGTCCTCGAAGTCCTCGTTCAGCTTGCC 257

Klon 4:          268 GAAGGCCGCGATCTNCGTCGGGCACACGAACGTGAAG 304
                  |||
NCBI-datenbank: 256 GAAGGCCGCGATCTCCGTCGGGCACACGAACGTGAAG 220

```

**Abb. 45: Vergleich des sequenzierten Teils des Klon 4 mit der Sequenz des *ahpC* von *M. smegmatis***

Wie Abb. 45 entnommen werden kann, zeigt die Insertionssequenz des Klon 4 eine hohe Übereinstimmung mit der *ahpC*-Sequenz aus *M. smegmatis*. Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des Oligonukleotids ‚ProTrapAntisense‘ vorgenommen. Das Insertionsfragment des Klon 4 deckt zum größeren Teil die Sequenz stromaufwärts des *ahpC* und zu einem kleineren Teil die kodierende Sequenz des *ahpC* ab. Dieses Fragment beinhaltet auch die beiden Transkriptionsstartpunkte, die von Dhandayuthapani et al. (1996) identifiziert worden sind. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass das Insertionsfragment des Klon 4 den *ahpC*-Promotor trägt.

```

Klon 21:          38 CCCCCTACTTACGCTGGCCGGGCGCAGTGCCCGCGACGG-ACGGCTCAAGTTGTCCTCG 96
                  |||
NCBI-Datenbank: 1362933 CCCCCTCG-CTTGCGGTGTC--GCTGCAGTGCCCGC-ACGGCACGGACCACGTCGTCGTC- 1362987

Klon 21:          97 CTGCCACTCGCTGCG-ACGACGGGCCTGGCCTCACCCTCCCGACC-TAGCACTCACCGGT 154
                  |||
NCBI-Datenbank: 1362988 CT-CGACGAGCAACGTACGCCGCACCCCGC-TCTTAG-CCGGATAGTCGAACTCCACTG- 1363043

Klon 21:          155 CGCGAGTGCCAACGTT-AT-TCTTAGCACT 182
                  |||
NCBI-Datenbank: 1363044 CGCCGCTGCTCAGCTCAGTGTTCGCACT 1363073

```

**Abb. 46: Vergleich der Insertionssequenz des Klon 21 mit der Datenbank des *Institute for Genomic Research* (<http://www.tigr.org/>).**

Die PCR-Fragmente von Klon 21 und von allen Klonen vom 8. Tages des Screenings sind identisch. Die Sequenz der Insertionsfragmente wurde mit der Datenbank des *Institute for Genomic Research* verglichen (Abb. 46 und Abb. 47). Dabei zeigte sich eine höhere Sequenzübereinstimmung mit einer *M. tuberculosis* Sequenz als mit der Datenbank für das Genom von *M. smegmatis*. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass der entsprechende Teil des Genoms von *M. smegmatis* noch nicht sequenziert worden ist. Der Sequenzvergleich mit dem *M. tuberculosis* Genom ist in Abb. 47 wiedergegeben.

```

Query: 128  TGGCCGGGCCGCGAGTGCCCGCGAACGGANCGGCTCANGTTGTCCTCGCTTGCCACTCGCT 187
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct: 2436 TGGCCGGGC-GCAGTGCCCGCGA-CGGA-CGGCTCAAGTTGTCCTCGCT-GCCACTCGCT 2381

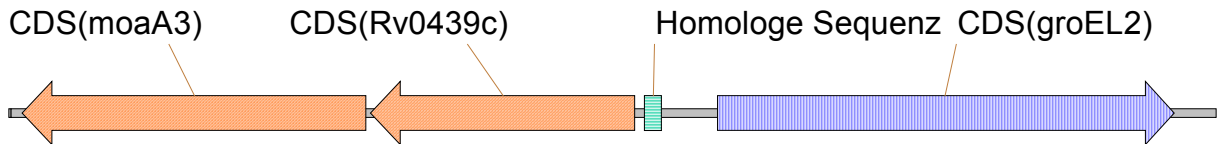
Query: 188  TGCGAACGAACGGGCCTGGCCTCACCGTCCCGACCTANCACTCACCGGTCGCGAGTGCCA 247
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct: 2380 -GCGA-CGA-CGGGCCTGGCCTCACCGTCCCGACCTAGCACTCACCGGTCGCGAGTGCCA 2324

Query: 248  ACGTTATTCCTTAGCACTCGCCTATGCCGAGTGCAAGAAAGCCCCGCACCGGGTAATGCC 307
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct: 2323 ACGTTATTCCTTAGCACTCGCCTATGCCGAGTGCAAG-AAGCCCCGCACCGGGTCATGCC 2265

Query: 308  CTCGTTTCNAC 317
          |||||  ||
Sbjct: 2264 CTCGTTTCGAC 2255

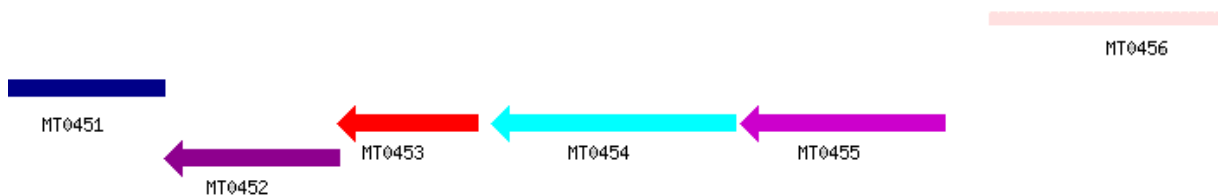
```

**Abb. 47:** Sequenzvergleich der Insertionssequenz des Klons 21 mit der Sequenz stromaufwärts des Genes Rv0439c.



**Abb. 48:** Lokalisation der homologen Sequenz auf dem *M. tuberculosis* Genom.

Die höchste Sequenzübereinstimmung wurde mit der Sequenz, die stromaufwärts des Genes Rv0439c liegt, gefunden (Abb. 47 und Abb. 48). Bei diesem Gen handelt sich um eine potentielle Oxidoreduktase mit bisher unbekannter Funktion. Nach der Benennung durch das *Institute for Genomic Research* wird dieses offene Leseraster mit MT0455 bezeichnet.



**Abb. 49:** Abschnitt auf dem Genom von *M. tuberculosis* in der Region des Genes MT0455.

In Abb. 49 ist die genomische Umgebung um das Gen MT0455 von *M. tuberculosis* dargestellt. Die dichte Abfolge der Gene MT0451 bis MT0455 kann bedeuten, dass es sich um ein Operon handelt. Name und vermutete Funktion sind in Tab. 17 wiedergegeben.

**Tab. 17: Bezeichnung der Loci und der offenen Leseraster stromabwärts der homologen Sequenz des Klons 21 am *Institute for Genomic Research***

Locus des ORF	Name
MT0455	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
MT0454	molybdopterin biosynthesis protein MoeA
MT0453	conserved hypothetical protein
MT0452	CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase
MT0451	cell division control protein, putative

Mit Hilfe der Promotorsuch-Software ‚Neural Network Promoter Prediction‘ (Harley & Reynolds, 1987), das sowohl zur Identifizierung von eukaryotischen als auch prokaryotischen Promotoren geeignet ist, wurde ein Transkriptionsstart auf der Sequenz des Klons 21 identifiziert. Die berechnete Wahrscheinlichkeit für diesen Transkriptionsstart ist mit 0,16 allerdings sehr gering.

Start	End	Score	Promoter Sequence
141	186	0.16	TAGCACTCACCGGTCGCGAGTGCCAA <u><b>CGTATTCT</b></u> TAGCA <u>C</u> TCGCCTATG

**Abb. 50: Vorhergesagter Promotor und Transkriptionsstart des Insertionsfragmentes vom Klon 21. Der Transkriptionsstart ist in der Sequenz unterstrichen und mit einem großen Buchstaben hervorgehoben. Eine mögliche -10 Region dieses Promotors ist unterstrichen und fett dargestellt.**

Die vorhergesagte -10 Region des Promotors zeigt große Homologie zu anderen -10 Regionen von mykobakteriellen Promotoren und stimmt mit der -10 Konsensussequenz von Mulder et al. (1997), TATAAT, in vier von sechs Nukleotiden überein. In Tab. 18 sind verschiedene -10 und -35 Regionen von mykobakteriellen Promotoren mit der möglichen homologen Sequenz des Promotors vom Klon 21 verglichen.

**Tab. 18: Vergleich verschiedener -35 und -10 Regionen von mykobakteriellen Promotoren. Übereinstimmungen mit der Sequenz des Klon 21 sind unterstrichen.**

Art	Gen strombwärts	-35 Region	-10 Region	Referenz
<i>M. smegmatis</i>		GCACTCACC <u>GGTC</u>	<u>TAT</u> TCT	Diese Arbeit
<i>M. tuberculosis</i>	mpt64	TTG <u>GCG</u>	<u>TAT</u> GTT	Oettinger et al. (1994)
<i>M. tuberculosis</i>	rpsL	TTG <u>ACC</u>	TATTGT	Kenney & Churchward (1996)
<i>M. tuberculosis</i>	T130	-	<u>TAT</u> GCT	Bashyam et al. (1996)
<i>M. tuberculosis</i>	T150, vap	TTGACA	<u>TAT</u> CAT	Bashyam et al. (1996)
<i>M. smegmatis</i>	Acetam.	TTG <u>ACT</u>	<u>TAT</u> ATT	Mahenthiralingam et al. (1993)
<i>M. smegmatis</i>	rpsL	TTGTTT	<u>TAT</u> GTT	Kenney & Churchward (1996)
<i>M. smegmatis</i>	rrnA P2	TTG <u>CAA</u>	<u>TAT</u> CTT	Gonzalez-y-Merchand et al. (1997)
<i>M. smegmatis</i>	S4	-	<u>TAT</u> AAG	Bashyam et al. (1996)
<i>M. smegmatis</i>	S21	-	<u>TAT</u> GGT	Bashyam et al. (1996)

Während sich eine potentielle -10 Region des Promotors mit guter Homologie vorhersagen lässt, ist eine -35 Region nicht deutlich zu bestimmen. Der *ahpC*-Promotor zeigt kein vergleichbares -10 Motiv. Eine erweitertes -10 Motiv, das sog TGN-Motiv, wie von Bashyam & Tyagi (1998) beschrieben, ist für das Fragment des Klon 21 nicht erkennbar.

Raman et al. (2001) fanden für Promotoren, die unter der Kontrolle des *sigH* stehen eine konservierte -10 und -35 Region, die von der von Mulder et al. (1997) beschriebenen abweicht, aber mit der Konsensussequenz von *sigR* bei *Streptomyces coelicolor* übereinstimmt (Paget et al., 1998). Manganelli et al. (2001) schließen auf Grund der Identifizierung von Genen, deren Expression von *sigE* abhängig ist, auf das diese Konsensussequenz die Bindungsstelle für den Sigma-Faktor E darstellt. Weitere Untersuchungen sind deshalb nötig, um auf die spezifischen Konsensussequenzen von Sigma-Faktoren bei Mykobakterien schließen zu können. Klon 21 zeigt in der potentiellen -10 Region das für *sigH* kontrollierte Promotoren typische cGTTTr-Motiv, ist aber in der möglichen -35 Region verschieden, zeigt also nicht das charakteristische gGgAAc-Motiv.

### 3.10 Promotorstärkemessung

Um die Promotorstärke von mykobakteriellen Promotoren erfassen zu können wurden zwei unterschiedlich Systeme aufgebaut. Beiden Systeme ist gemein, dass ein Reporter-Gen zur Erfassung der Expression eines stromabwärts vom Promotor gelegenen Genes diene. Dafür wurde zum einen *lacZ* und zum anderen GFP verwendet. Das Signal dieser Reporter-Gene muss auf eine Referenzgröße für die Biomasse oder die Expressionsrate der gesamten Kultur bezogen werden. Um die Expressionsrate der Bakterienkultur zu erfassen, wurde ein zweites Reporter-Gen kloniert, das unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors stromaufwärts des *rpsL* steht. Bei diesem zweiten Reporter-Gen handelt es sich um die bakterielle Luziferase. Die GFP-Expression wurde auf die optische Dichte oder auf die erfasste fluoreszierende Fläche im Mikroskop bezogen.

#### 3.10.1 Konstruktion der Vektoren zur Promotorstärkemessung und Klonierung mykobakterieller Promotoren

Um diese Messungen durchführen zu können, mussten die Plasmide pGPC25G:*luxAB* und pPGFP erstellt werden. Für die Erfassung der Promotorstärke mittels *lacZ* wurde das Plasmid pTRAP verwendet. Die Konstruktion dieses Plasmids ist unter 3.9.2 beschrieben.

##### 3.10.1.1 Vektor zur *luxAB*-Expression und Klonierung der Promotoren

Die Expression von *luxAB* und *lacZ* auf einem Plasmid war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Die beiden Reporter-Gene wurden deshalb auf zwei Plasmide verteilt. *luxAB* wurde unter der Kontrolle des *rpsL*-Promotors von *M. bovis* BCG auf dem integrativem Vektor pMV261-*rpsL*+ exprimiert. Damit für die Aufrechterhaltung der Transformation durch diesen Vektor selektiert werden kann, bei gleichzeitiger Transformation mit einem kompatiblen Plasmid, das das Kanamycin-Resistenz-Gen *aph* exprimiert, wurde *aph* durch das Gentamycin 3-acetyltransferase-Gen ausgetauscht. Dafür wurde das Gentamycin-Resistenz-Gen-tragende Fragment aus dem Vektor pBSL141 (Alexeyev & Shokolenko, 1995) über einen *SmaI/HindIII*-Verdau isoliert und in den mit *SspI* und *HindIII* geöffneten Vektor pMV261-*rpsL*+ inseriert. Dieser neue Vektor wird mit pGPC25G bezeichnet. Mit diesem Plasmid transformierte Zellen sind gegen Gentamycin resistent und gegen Kanamycin sensitiv. In die *HindIII*-Schnittstelle wurde dann das promotorlose *luxAB* aus dem Vektor pUTkm1 (de Lorenzo et al., 1990) kloniert. Der entstandene Vektor wird pGPC25g:*luxAB* genannt. Durch den Austausch des Kanamycin-Resistenz-Genes durch das Gentamycin-Resistenz-Gen und die

Tatsache, dass integrative Mykobakterienvektoren mit nicht integrativen Vektoren kompatibel sind, ließen sich *M. smegmatis*-Zellen in einem Ansatz mit beiden Vektoren transformieren.

Die Isolierung von Promotoren mittels des Plasmids pTRAP ist unter 3.9.3 beschrieben. *M. smegmatis*-Zellen wurden mit den isolierten Plasmiden pTRAP:Klon4 und pTRAP:Klon21 sowie dem Plasmid pGPC25G:luxAB transformiert. Die resultierenden Klone zeigten *lacZ*- und *luxAB*-Expression.

Um die intra- und extrazelluläre Promotorstärke mit einem induzierten Promotor vergleichen zu können, wurde das DNA-Fragment stromaufwärts des *cysD*, das den potentiellen Promotor trägt über PCR amplifiziert. *cysD* ist ein phagosomal-induziertes Gen von *M. bovis* BCG (Triccas et al., 1999). Für *M. smegmatis* sind phagosomal-induzierte Promotoren nicht bekannt. Für die PCR wurden die Oligonukleotide ‚PcysDfw‘ und ‚PcysDrv‘ verwendet. Das PCR-Produkt wurde in die *SwaI*- und *BamHI*-Schnittstellen des Vektors pTRAP kloniert und die Sequenz mittels mehrfacher Sequenzierung bestätigt.

#### 3.10.1.2 Konstruktion des Vektors pPGFP und Klonierung verschiedener Promotoren

Als Ausgangsplasmid wurde der Vektor pTRAP verwendet. Die Gene *hly*, *rpsL* und *lacZ* wurden durch einen *KpnI/PstI*-Verdau deletiert und ein synthetisches Verbindungsstück inseriert. Dieses synthetische Verbindungsstück besteht aus den beiden Oligonukleotiden ‚LinkGTGfw‘ und ‚LinkGTGrv‘. Das so entstandene Plasmid wird pPGFP1 genannt. Durch die Restriktion mit *SwaI* und *PstI* konnte das Fragment isoliert werden, das die Terminatoren des Vektors pTRAP trägt, und in die *SwaI*- und *PstI*-Restriktionsschnittstellen des Vektors pPGFP1 inseriert werden. Dieses Plasmid wird mit pPGFP2 bezeichnet. Aus dem Vektor pGPC 41 wurde das GFP kodierende Fragment mittels eines *BamHI*- und *HindIII*-Verdaues isoliert und direktional in den neu konstruierten Vektor pPGFP2 kloniert. Dieser neue Vektor beinhaltet zwei *BamHI*-Restriktionsschnittstellen. Um eine Klonierung in die Restriktionsschnittstellen *SwaI* und *BamHI* zu ermöglichen wurde der Vektor mit *BamHI* und *PacI* geschnitten und ein zweites synthetisches DNA-Fragment in den Vektor gebracht. Dafür wurden die Oligonukleotide ‚LinkGTGfw‘ und ‚LinkGTGrv‘ verwendet. Der resultierende Vektor zeigte nur eine sehr leicht erhöhte Grundfluoreszenz im grünen Bereich gegenüber dem Wildtyp.

Für die Klonierung des *rpsL*- und *sigE*-Promotors wurden die promotortragenden DNA-Fragmente mittels PCR aus dem Genom von *M. smegmatis* amplifiziert und in die *SwaI*- und

*Bam*HI-Schnittstellen inseriert. Dafür wurden die Oligonukleotide ‚P *sigE* fw‘, ‚P *sigE* rv *Bam*HI‘, ‚P *rpsL* fw‘ und ‚P *rpsL* rv *Bam*HI‘ verwendet.

Die Oligonukleotide sind so ausgewählt, dass das PCR-Produkt den Transkriptionsstart in *M. smegmatis*, der für *sigE* von Wu et al. (1997) und für *rpsL* von Kenney & Churchward (1996) beschrieben worden sind, mit einschließt.

Der HSP60-Promotor wurde mit *Swa*I aus dem Vektor pTRAP:P<sub>HSP60</sub> isoliert und in die *Swa*I-Schnittstelle des Vektors pPGFP inseriert. Das promotortragende DNA-Fragment, das aus dem Klon 4 der genomischen DNA-Bank isoliert worden ist, wurde über die Schnittstellen *Pac*I und *Swa*I in den Vektor pPGFP umklont.

### 3.10.2 Messung der Promotorstärke

Die mit Hilfe des Promotor-Such-Systems isolierten Promotoren wurden durch Messung der extra- und intrazellulären Promotorstärke in RAW 264.7-Zellen und Messung von Mikromilieufaktoren auf die Promotorstärke weiter charakterisiert.

#### 3.10.2.1 Promotoraktivität in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Die Promotorstärken verschiedener Promotoren wurde mit Hilfe von Reporter-Genen erfasst. In Abb. 51 ist die Wachstumsrate von *M. smegmatis*-Transformanten, die den Vektor pGPC25g:*luxAB* und den Vektor pTRAP oder pTRAP:P<sub>HSP60</sub> tragen, so wie die Promotoraktivität des HSP60-Promotors und des *rpsL*-Promotors dargestellt.



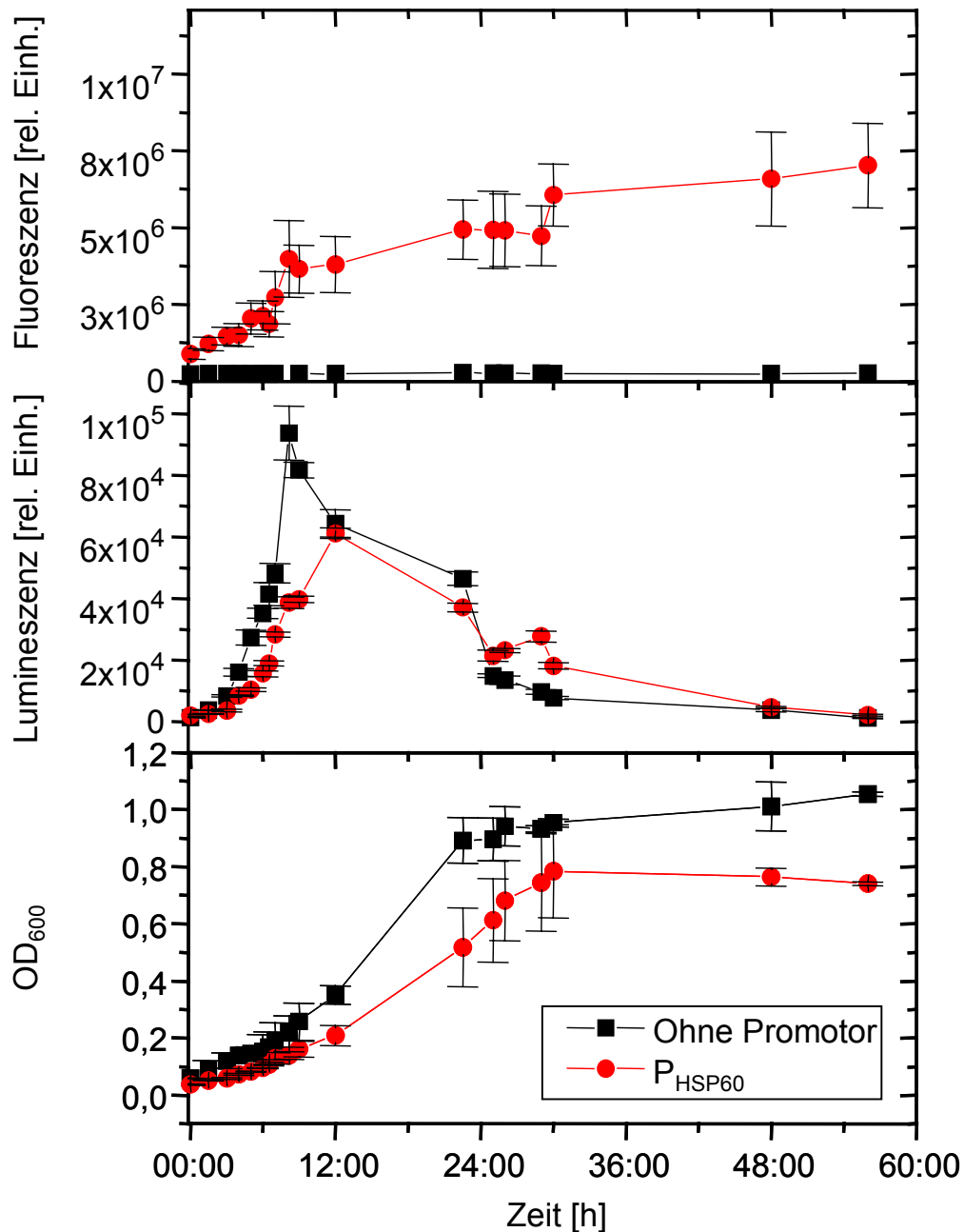
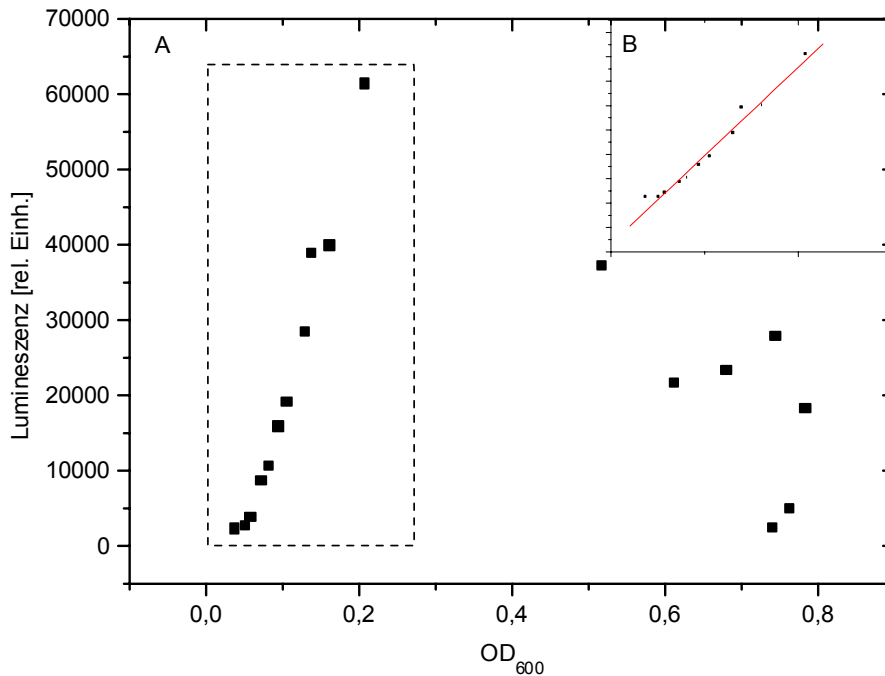


Abb. 51: Messung der optischen Dichte bei 600 nm (C), der *luxAB*-Expression unter der Kontrolle des *rpsL*-Promotors (B) und der *lacZ*-Expression unter der Kontrolle des HSP60-Promotors (A).

Wie man anhand der unterschiedlichen Zunahme der optischen Dichte erkennen kann, wachsen Transformanten, die den Vektor pTRAP mit HSP60-Promotor tragen, langsamer als Transformanten, die den Vektor pTRAP ohne Promotor tragen. Promotortragende Transformanten zeigen eine längere logarithmische Wachstumsphase und erreichen in der stationären Phase nur eine geringere Bakteriendichte. Die *lacZ*-Expression von Transformanten, die *lacZ* unter der Kontrolle des HSP60-Promotors exprimieren, nimmt annähernd parallel mit der optischen Dichte zu. Die Aktivität des HSP60-Promotors bleibt demzufolge in den unterschiedlichen Wachstumsphasen konstant. Die Expression von *luxAB* nimmt hingegen mit Be-

ginn der Wachstumsphase stark zu, erreicht vor der späten logarithmischen Wachstumsphase ihr Maximum und fällt daraufhin wieder stark ab.

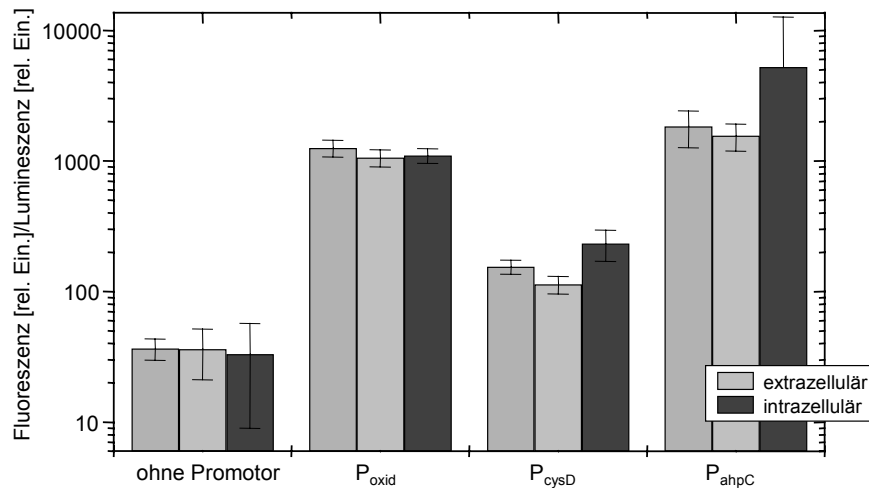


**Abb. 52:** Korrelation zwischen der optischen Dichte bei 600 nm und der *luxAB*-Expression unter der Kontrolle des *rpsL*-Promotors. B zeigt einen Ausschnitt aus A, der durch eine unterbrochene Linie markiert ist.

Während der sog. lag-Phase und der frühen exponentiellen Wachstumsphase ist eine gute Korrelation zwischen der Luzifizieraseaktivität und der optischen Dichte erkennbar (Abb. 52). In der stationären Phase ist diese Korrelation nicht gegeben.

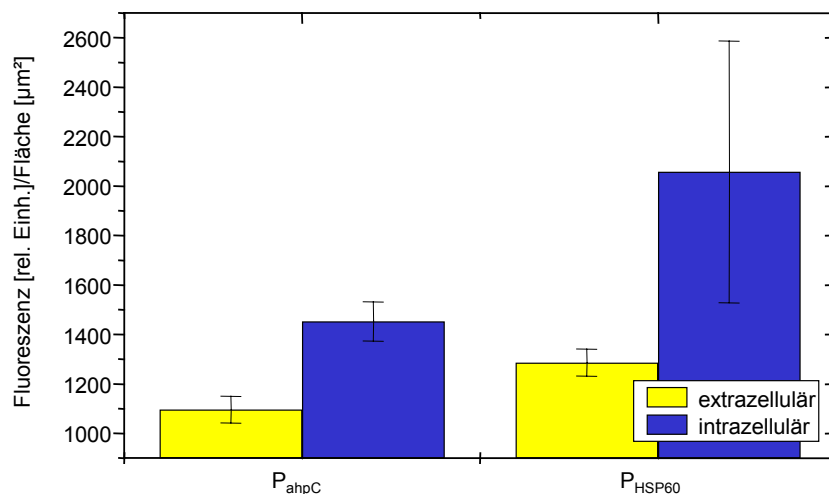
### 3.10.2.2 Vergleich der intra- und extrazellulären Promotoraktivität

Unter Verwendung des *lacZ/luxAB*-Messsystems wurden die Promotorstärken der Klone 4 und 21, sowie des *cysD*-Promotors aus *M. bovis* BCG erfasst. Alle Promotoraktivitäten wurden intrazellulär in RAW 264.7-Zellen und extrazellulär im selben eukaryotischen Medium gemessen. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 53 dargestellt.



**Abb. 53:** Verhältnis der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität zur Luziferase-Aktivität bei extrazellulärem und intrazellulärem Wachstum.

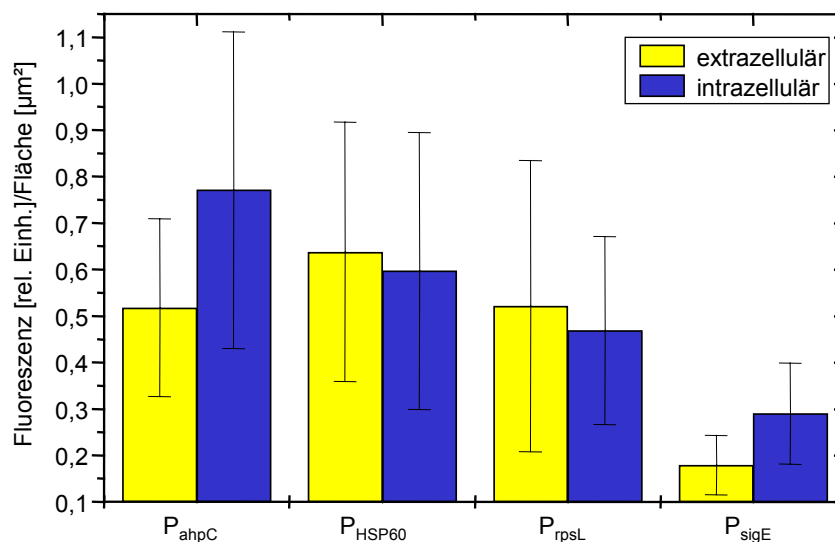
Da beim Messen der Promotorstärke der extrazellulären Bakterien ein Zentrifugationsschritt durchgeführt werden muss, der bei der intrazellulären Promotorstärkemessung wegfällt, wurden zwei extrazelluläre Bakterienpopulationen getrennt untersucht. Diese beiden Populationen zeigten nur im Fall des *cysD*-Promotors eine signifikante Abweichung. Wie Abb. 53 entnommen werden kann, zeigten alle in diesem Versuch untersuchten Promotoren ein signifikant höheres Verhältnis von *lacZ*- zu *luxAB*-Aktivität als der Vektor ohne Promotor. Alle drei Promotoren waren extrazellulär konstitutiv. Beim Vergleich mit der intrazellulären Promotorstärke wird deutlich, dass sowohl der *cysD*-Promotor als auch der *ahpC*-Promotor signifikant induziert sind. Der *ahpC*-Promotor wurde durch einen *PacI/SwaI*-Verdau isoliert und in den Vektor pPGFP umkloniert und erneut gemessen.



**Abb. 54:** Vergleich der extrazellulär und intrazellulär Expressionsrate von GFP unter der Kontrolle des *ahpC*-Promotors und des HSP60-Promotors. Die Zellen wurden 4 h nach Infektion fixiert.

In Abb. 54 wurde die extrazelluläre und intrazelluläre Promotorstärke des *ahpC*-Promotors und des HSP60-Promotors verglichen. Dabei wird deutlich, dass der HSP60-Promotor 4 h nach Infektion eine stärkere Expressionsrate bewirkt als der *ahpC*-Promotor. Beide Promotoren zeigten eine signifikante Induktion durch RAW 264.7-Zellen.

Dieses Experiment wurde wiederholt und die Zeit nach der Infektion auf 8 h verlängert. Zusätzlich wurden zwei weitere Promotoren, der *sigE*-Promotor und der *rpsL*-Promotor, untersucht. Wie in Abb. 55 dargestellt, zeigt der *ahpC*-Promotor auch noch nach 8 h eine erhöhte intrazelluläre Expression in RAW 264.7-Phagosomen gegenüber extrazellulären Bakterien. Die Expression unter Kontrolle des HSP60-Promotor ist 8 h nach Infektion bei intrazellulären Bakterien auf gleichem Niveau wie das der extrazellulären Zellen. Auch die Expressionsrate des *rpsL*-Promotors liegt 8 h nach Infektion extrazellulär wie intrazellulär auf gleichem Niveau. Der *sigE*-Promotor zeigt intrazellulär eine leicht erhöhte Expressionsrate. Von den untersuchten Promotoren ist der *sigE*-Promotor, der mit der geringsten Aktivität.



**Abb. 55: Vergleich der extrazellulären und intrazellulären Promotorstärke 8 h nach der Infektion von RAW 264.7-Zellen.**

Die Induktion der getesteten Promotoren durch unterschiedliche Mikromilieufaktoren wurde in weiteren Versuchen erfasst. In Abb. 56 ist der zeitliche Verlauf der Promotorinduktion für 5 h dargestellt.

### 3.10.2.3 Induktion von mykobakteriellen Promotoren durch Mikromilieueinflüsse

Der Einfluss von zwei Mikromilieufaktoren, dem pH-Wert und der Wasserstoffperoxidkonzentration, auf die mykobakterielle Promotoraktivität wurden untersucht. Wie zu erwarten ist, zeigt der *rpsL*-Promotor keine Induktion durch Zugabe von 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es kommt durch die

Zugabe von 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  nur für sehr kurze Zeit zu einer Abnahme der *rpsL*-Expression. Schon 13 min nach  $\text{H}_2\text{O}_2$  –Induktion befindet sich die *rpsL*-Expression wieder auf dem gleichen Niveau verglichen mit dem Kontrollansatz ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

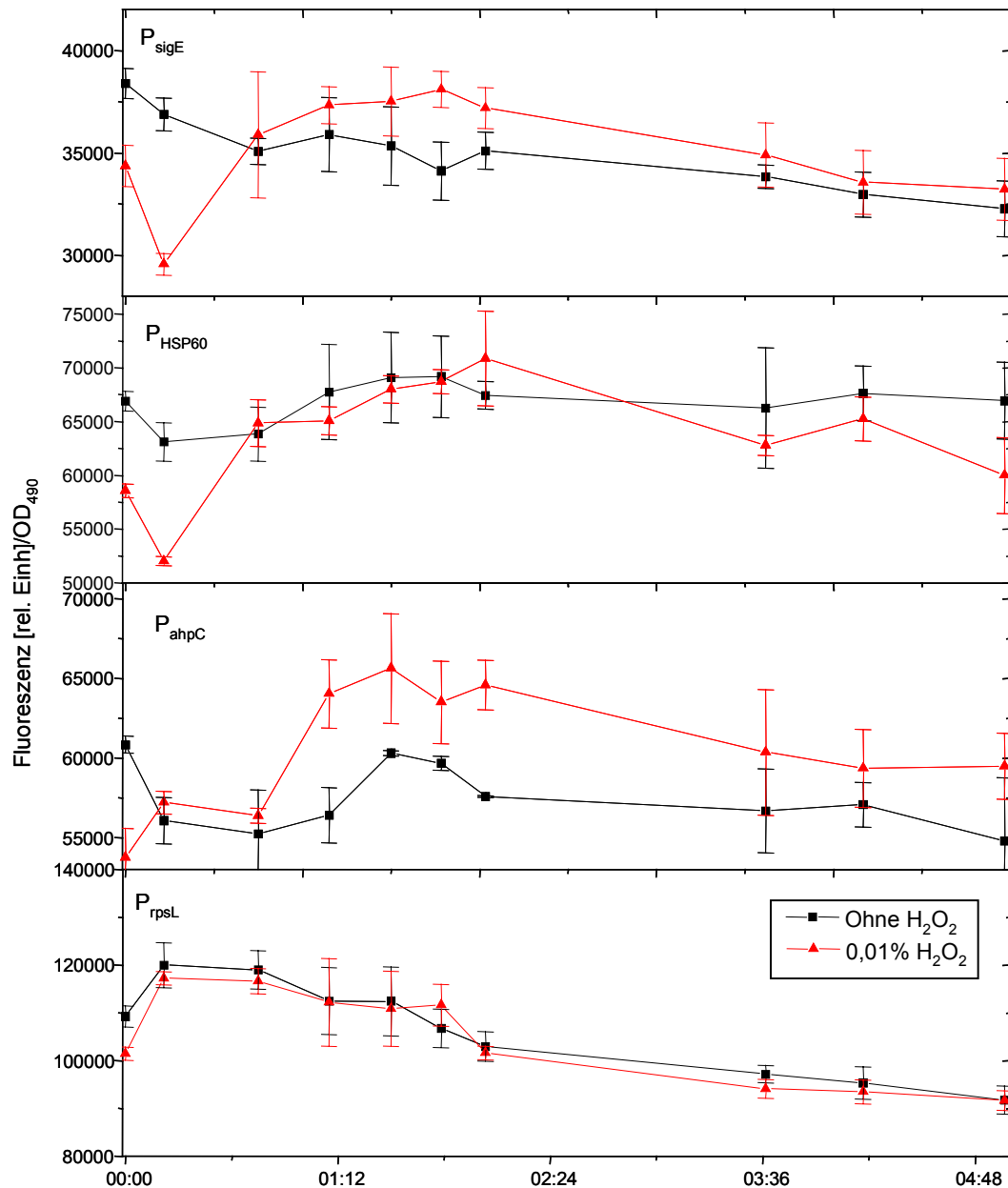


Abb. 56: Vergleich der Expressionsrate von GFP unter der Kontrolle verschiedener Promotoren mit und ohne Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Das *ahpC*-Promotor tragende Fragment zeigt hingegen schon nach ca. 10 min eine deutlich Induktion durch Wasserstoffperoxid. Der HSP60-Promotor weist keine erkennbare  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Induktion auf. Der Promotor von *sigE* hingegen lässt eine im Vergleich zum *ahpC*-Promotor eine verringerte, aber deutliche Induktion erkennen. Die Aktivität des *sigE*- und HSP60-Pro-

motors geht in den ersten 13 min nach Induktion stark zurück, steigt nach 45 min aber wieder auf das Niveau der Kontrolle.

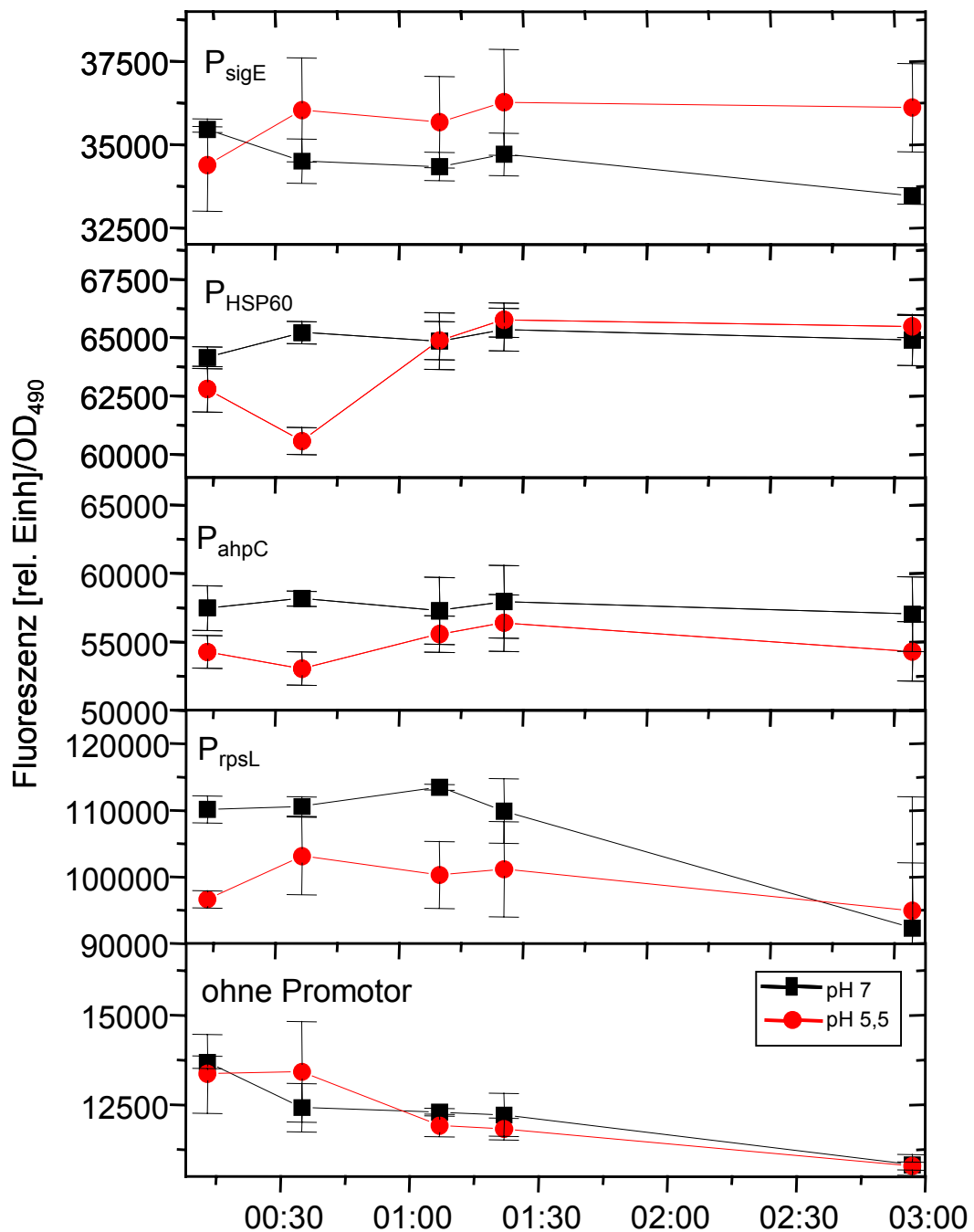
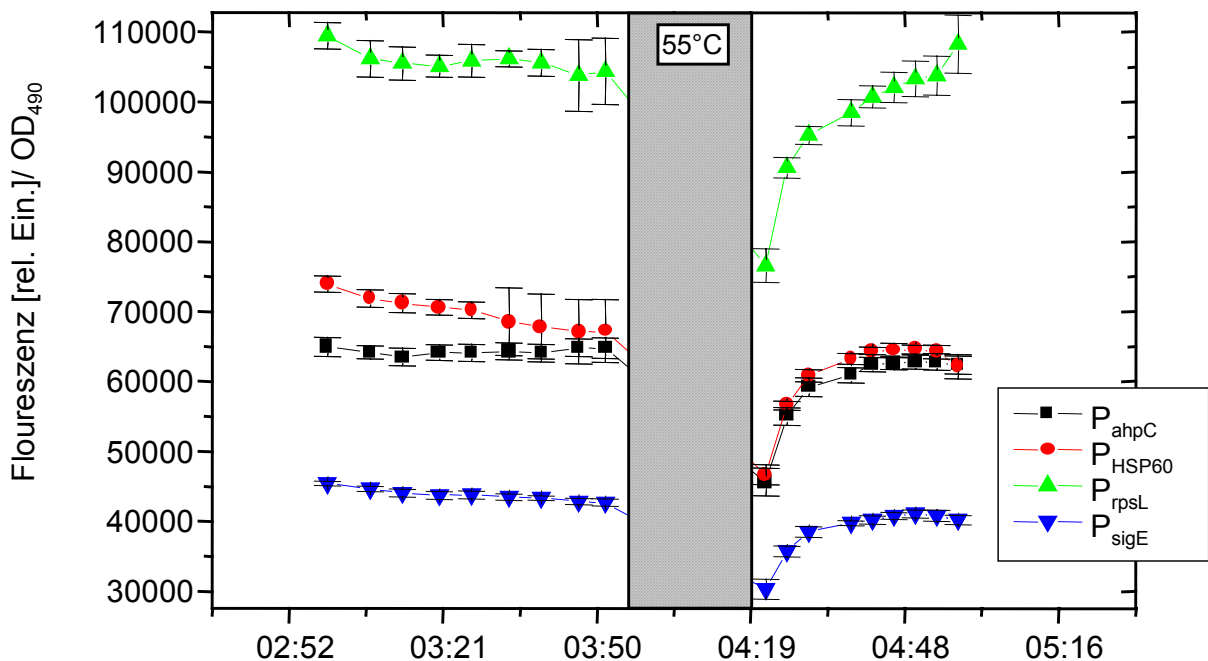


Abb. 57: Expressionsrate verschiedener Promotoren bei pH 7 und pH 5,5 über einen Zeitraum von 3 h nach Induktion durch Zugabe von HCl.

Der pH-Wert hat einen deutlichen Einfluss auf die Expressionsrate der untersuchten Promotoren (Abb. 57). Bei allen untersuchten Promotoren kommt es nach Zugabe von HCl und damit nach Verminderung des pH-Wertes von 7 auf 5,5 zu einer Abnahme der GFP-Fluoreszenz. Die Expressionsrate des *rpsL*-Promotors verläuft in den ersten 60 min annähernd parallel zur

Kontrolle. Der Rückgang der Promotoraktivität ist bei der Kultur bei pH 5,5 geringer als bei der Kontrolle bei pH 7. Die Aktivität des *ahpC*-Promotor bleibt in beiden Ansätzen annähernd konstant. Bei pH 5,5 ist sie geringer als bei pH 7. Die Expression unter der Kontrolle des HSP60-Promotors geht bei pH 5,5 nach 35 min stark zurück, steigt dann aber wieder auf das Niveau der Kontrolle. Der HSP60-Promotor ist folglich kurzzeitig reprimiert durch eine Verminderung des pH-Wertes. Der *sigE*-Promotor hingegen zeigte eine signifikante und dauerhafte pH-Induktion. Bereits nach 35 min liegt die *sigE*-Promotoraktivität bei pH 5,5 höher als bei pH 7.



**Abb. 58:** Promotoraktivität verschiedener Promotor vor und nach einem 30 min Hitzeschock von 55° C.

Wie in Abb. 57 zu erkennen ist, zeigt keiner der untersuchten Promotoren eine signifikante Induktion nach einem Hitzeschock von 55°C für 30 min. Bei allen untersuchten Promotoren nimmt die Expressionsrate nach dem Hitzeschock sprunghaft ab, ging aber nach 20 min auf ihr ursprüngliches Niveau zurück.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung der Hämolyse *tlyA* und *hly* auf Makrophagen bei Expression in einem mykobakteriellen Modellsystem zu charakterisieren. Auf Grund der Ergebnisse dieser Untersuchungen war es möglich ein System zu entwickeln, das zur Identifizierung eines phagosomal-induzierten Promotors führte.

### 4.1 Überlebensrate und Zytotoxizität

Die Expression von potentiellen Virulenzgenen in apathogenen Bakterien und das Messen der durch dieses Gen veränderten Überlebensrate stellt ein Verfahren zur Identifizierung (Falcone et al., 1995; Mundayoor & Shinnick, 1994; Wei et al., 2000) und Charakterisierung von Virulenzgenen dar (Batoni et al., 2001; Bielecki et al., 1990; Fazal, 1997; Hess et al., 1998; Miller & Shinnick, 2000; Plum et al., 1997; Portnoy et al., 1992; Wieles et al., 1997). Bei solchen Versuchen zeigte sich, dass unterschiedliche Gene aus *Mycobacterium tuberculosis* (Wei et al., 2000), *M. avium* (Plum et al., 1997), *M. leprae* (Wieles et al., 1997) und *M. bovis* BCG (Falcone et al., 1995) die Überlebensrate von *M. smegmatis* in Makrophagenkulturen erhöhen können. Andererseits bringt beispielsweise die Expression des Katalase-Genes *katG*, das mit der Virulenz dieses Erregers in Verbindung steht (Collins, 1996), oder der Phospholipase C *plcA* aus *M. tuberculosis* für *M. smegmatis*-Transformanten keinen Überlebensvorteil (Fazal, 1997; Miller & Shinnick, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Genprodukte des *hly*, eines Virulenz-Gens von *Listeria monocytogenes* (Cossart, 1988; Geoffroy et al., 1987), und *tlyA*, eines möglichen Virulenz-Gens von *M. tuberculosis* (Wren et al., 1998), auf das Überleben von *M. smegmatis*, einer apathogenen Mykobakterienart, in HMDH- und THP-1-Zellen untersucht.

Für diese Strategie ist eine geringe Resistenz des Modellorganismuses gegenüber intrazellulärer Abtötung durch Phagozyten von großer Bedeutung (Barker et al., 1996). Nach Barker et al. (1996) wird *M. smegmatis* in adhärenenten HMDM-Kulturen nicht abgetötet. Wieles et al. (1997) hingegen zeigten für *M. smegmatis*, dass schon nach 60 min 50% aller Bakterienzellen abgetötet wurden. Plum et al. (1997) beschreiben eine starke Abnahme der Überlebensrate von *M. smegmatis* in HMDM. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nahm die Überlebensrate ebenfalls schon nach 24 h ab. Für die Makrophagen-Zelllinie THP-1 wurde ein Abtöten von *M. smegmatis* beschrieben (Miller & Shinnick, 2000; Wei et al., 2000). Sto-



kes & Doxsee (1999) zeigten, dass die Interaktion von *M. tuberculosis* mit THP-1- und HMDM-Zellen vergleichbar ist. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit THP-1 Makrophagen wiederholt. Die Abnahme der CFU von *M. smegmatis* in THP-1-Kulturen, wie sie in dieser Arbeit festgestellt wurde (Abb. 8, S. 42), ist, verglichen mit der Abnahme in J774-Zellen, wie von Pagan-Ramos et al (1998) und Kühnel et al. (2001) beschrieben, relativ gering. So nahm die Zahl der CFU in THP-1-Kulturen ca. um die Hälfte ab, während sie in J774 auf ein Zehntel (Pagan-Ramos et al., 1998) bzw. ein Sechzigstel (Kuehnelt et al., 2001) abnahm. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *M. smegmatis* intrazellulär über einen Zeitraum von mehreren Tagen abgetötet wird. Verglichen mit der Überlebensrate von anderen Bakterien wie z.B. *Streptococcus agalactiae*, der Erreger der neonatalen Meningitis (Poyart et al., 2001), zeigt *M. smegmatis* aber eine hohe Resistenz gegenüber dem Mikromilieu des Phagosoms. Dies wurde in dieser Arbeit sowohl bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung, als auch bei den Experimenten zur intrazellulären Promotoraktivität deutlich. So waren auch 9 h nach der Infektion nur sehr wenige degradierte Bakterienzellen durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen feststellbar (C. de Chastellier, pers. Mitt.) und es konnte 8 h nach der Infektion eine deutliche GFP-Fluoreszenz von intrazellulären *M. smegmatis*-Zellen gemessen werden (Abb. 55, S. 84). Der Mechanismus dieser Resistenz ist bisher unbekannt. Die Fusion von *M. smegmatis* tragenden Phagosomen mit frühen Endosomen und Lysosomen wurde von Mohaghehpour et al. (2000) für Makrophagen und dendritische Zellen festgestellt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Phagosom von *M. smegmatis* vergleichsweise geringe Konzentrationen des Transferrin-Rezeptors aufweist (3.4, S. 43). Für pathogene Mykobakterien wurde nachgewiesen, dass die Konzentration des Transferrin-Rezeptor, der für frühe Endosomen charakteristisch ist, in diesen Phagosomen vergleichsweise hoch ist (Clemens & Horwitz, 1995; Clemens & Horwitz, 1996; Sturgill-Koszycki et al., 1996). Deshalb muss ein anderer Mechanismus, als der von pathogenen Mykobakterien, für die intrazelluläre Resistenz des Wildtyps von *M. smegmatis* in Phagosomen angenommen werden. Es ist vorstellbar, dass 1. *M. smegmatis* die phagosomalen Mikromilieubedingungen über einen Zeitraum von Stunden tolerieren kann, 2. *M. smegmatis* toxischen Einflüssen wie z.B. oxidativen Stress durch die Expression von *katG* und *ahpC* oder anderer Gene ausgleichen kann oder 3. eine Inhibierung toxischer Prozesse stattfindet. Im Vergleich zu *M. avium* und *M. bovis* BCG ist *M. smegmatis* deutlich sensitiver gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress (Sherman et al., 1995). Auch die Versuche von Wieles et al. (1997) legen nahe, dass oxidativer Stress eine große Rolle für das intrazelluläre Überleben von *M. smegmatis* spielt. Weitere

Untersungen sind nötig, um die Faktoren, die für das intrazelluläre Überleben von *M. smegmatis* wichtig sind, bewerten zu können.

Listeriolysin ist für die Virulenz von *Listeria monocytogenes* von entscheidender Bedeutung (Barry et al., 1992; Portnoy et al., 1992). Zur Bestätigung der Bedeutung dieses Genes für das intrazelluläre Überleben wurde das Listeriolysin kodierende Gen *hly* in verschiedenen Bakterienarten exprimiert und deren Überlebensrate bestimmt. Für *Bacillus subtilis*-Transformanten konnte eine deutlich erhöhte Überlebensrate in J774-Makrophagen gegenüber dem Wildtyp gezeigt werden (Bielecki et al., 1990). Für *Salmonella dublin* brachte die Expression von *hly* keine Veränderung der Überlebensrate in J774-Makrophagen (Gentshev et al., 1995). Im Gegensatz zu *B. subtilis* und *S. dublin* verringert die *hly*-Expression bei *Brucella suis* (Köhler et al., 2001) und *M. bovis* BCG (Hess et al., 1998) die Überlebensfähigkeit in Makrophagen.

In den Experimenten dieser Arbeit zeigen *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen eine deutlich höhere Überlebensrate in HMDM- und THP-I-Kulturen. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit *tlyA*-exprimierenden Zellen erzielt. Bei beiden Transformanten blieb die Anzahl an CFU auf einem mehr oder weniger konstanten Niveau. Eine deutliche Zunahme der CFU wie für *hly*-exprimierende *B. subtilis*-Transformanten beschrieben (Bielecki et al., 1990), wurde für *M. smegmatis*-Transformanten nicht festgestellt. Die Überlebensrate dieser *M. smegmatis*-Transformanten ist mit der Überlebensrate des *M. bovis* BCG-Wildtyps vergleichbar.

Die erhöhte Resistenz gegenüber intrazellulärer Abtötung durch Makrophagen konnte in dieser Arbeit in Zusammenhang mit der verminderten Ansäuerung des Phagosoms gebracht werden (4.2). Bei neutralem pH-Wert sind lysosomale Proteasen wie Cathepsin D nicht aktiv (Yamamoto et al., 1979; Yasuda et al., 1999). So weist Cathepsin D bei einem pH-Wert von 5,5, dem phagosomalen pH-Wert des Wildtyps von *M. smegmatis* (Kuehn et al., 2001; Moghaghpour et al., 2000), 70% seiner maximalen enzymatischen Aktivität auf, bei einem pH-Wert von 6,2, dem phagosomalen pH-Wert von pathogenen Mykobakterien (Kuehn et al., 2001), weniger als 30% der maximalen Aktivität (Yasuda et al., 1999). Dieser Schutz vor bakteriziden Proteasen hat größere Bedeutung für das intrazelluläre Überleben als die schädliche Wirkung des niedrigen pH-Wertes selbst (de Chastellier & Thilo, 1999). So lassen *M. smegmatis*-Kulturen bei pH 5 nur eine leicht verminderte Wachstumsrate gegenüber Kulturen bei pH 7 erkennen. Rao et al. (2001) fanden eine Wachstumsrate von *M. smegmatis* bei pH 4,5, die zwar um den Faktor 3 kleiner ist, als die Wachstumsrate bei pH 7, aber immer noch positiv. Auch in dieser Arbeit ließen *M. smegmatis*-Kulturen bei pH 5 eine positive Wachs-

tumsrate erkennen und zeigten bei diesem pH-Wert eine Proteinexpression, wie anhand der Aktivität des *rpsL*-Promotors deutlich wird.

Die hämolytische Aktivität von pathogenen Mykobakterien (Brzychcy et al., 1997; Deshpande et al., 1998; Maslow et al., 1999; Wren et al., 1998) und von *Helicobacter pylori* (Martino et al., 2001) ist kontaktabhängig. Obwohl King et al. (1993) berichteten, dass *M. bovis* BCG keine hämolytische Aktivität besitzt, konnte in dieser Arbeit Hämolyse durch *M. bovis* BCG-Kolonien auf Schafblutagar beobachtet werden (Abb. 4, S. 38), die mit der für *M. tuberculosis* und *M. avium* auf Blutagar vergleichbar ist (Gomez et al., 2001). Durch Westernblotnachweis wurde deutlich, dass TlyA in *M. smegmatis* in der Zellwand lokalisiert ist. Durch diese Lokalisation lässt sich die Kontaktabhängigkeit der Hämolyse erklären, da eine direkte Interaktion zwischen TlyA und einer eukaryotischen Membran, wie der Zellmembran von Erythrozyten, möglich ist. Für TlyA aus *Brachyspira hyodysenteriae* wurde vermutet, dass es sich wie im Fall von *slyA* aus *Salmonella typhimurium* lediglich um einen Transkriptionsfaktor für *sheA*, ein *E. coli*-Hämolysin, handelt (Hsu et al., 2001). *slyA* aus *S. typhimurium* wurde zunächst für ein Hämolysin gehalten (Libby et al., 1994). Durch weitere Untersuchungen konnte aber gezeigt werden, dass es sich bei dem Genprodukt von *slyA* nicht um ein Hämolysin handelt, sondern um ein regulatorisches Protein, das u.a. die Expression von *sheA*, einem Hämolysin aus *E. coli*, aktiviert (Ludwig et al., 1995). Gegen die Annahmen von Hsu et al. (2001) sprechen mehrere Tatsachen. So zeigt TlyA eine hämolytische Wirkung sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien (Martino et al., 2001; Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; ter Huurne et al., 1992; Wren et al., 1998). Wenn TlyA in *E. coli* expriert wird, kann Hämolyse erst nach dem Aufschließen der *E. coli*-Zellen festgestellt werden (Martino et al., 2001; Wren et al., 1998). Die verwendeten *E. coli*-Stämme JM109 und BL21 sind nicht hämolytisch. Das rekombinante TlyA aus *Helicobacter pylori* wurde vor der Untersuchung aufgereinigt (Martino et al., 2001), so dass Kontaminationen durch *E. coli*-Proteine nicht anzunehmen ist. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass es sich beim TlyA um ein Hämolysin handelt und nicht um einen Transkriptionsfaktor.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Überlebensrate von *tlyA*- und *hly*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen kann in der Bildung einer Pore in die Membran des Makrophagen gesehen werden. Porenbildende Hämolysine binden erst an die Zellmembran, die sie dann durchdringen, was zu einer veränderten Permeabilität der Membran führt (Rowe & Welch, 1994). Durch die Zugabe von osmotisch wirksamen Substanzen wie Dextran kann die Hämolysin-

bedingte Lyse der Zelle verhindert werden (Moayeri & Welch, 1994). Hyatt & Jones (1997; 1997) zeigten für TlyA aus *Brachyspira hyodysenteriae*, dass die hämolytische Wirkung von TlyA besser durch Porenbildung als durch enzymatische Aktivität erklärt werden kann. Ein entsprechender Mechanismus konnte für das TlyA aus *Helicobacter pylori* nachgewiesen werden (Martino et al., 2001). Nach Stabler & Wren (Martino et al., 2001) besteht diese Abhängigkeit auch für TlyA aus *M. tuberculosis*. TlyA aus *M. tuberculosis* ist in der Aminosäuresequenz mit TlyA aus *M. bovis* identisch, zeigt 43% Übereinstimmung mit dem TlyA aus *H. pylori* und 40% Übereinstimmung mit dem TlyA aus *B. hyodysenteriae* (Wren et al., 1998). Die Tatsache, dass TlyA eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Transmembrandomäne aufweist (Abb. 37 und Abb. 38) und dass TlyA aber nicht in der Zellmembran von *M. smegmatis* lokalisiert ist, spricht ebenfalls dafür, dass TlyA eine Pore in eine eukaryotische Membran bildet. Eine potentielle Transmembrandomäne wurde auch für Listeriolysin gefunden, aber nicht für das S12-Protein oder die  $\beta$ -Laktamase aus *M. tuberculosis* (Daten nicht gezeigt). Auf Grund dieser Ergebnisse scheint das TlyA von *M. tuberculosis* zu den porenbildenden Hämolytinen zu gehören.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *M. smegmatis*-Zellen, die *tlyA* oder *hly*-exprimieren, eine erhöhte Zytotoxizität für THP-1-Zellen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Ein Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und der Expression von TlyA wurde auch für *Brachyspira hyodysenteriae* gezeigt (Muir et al., 1992). *M. tuberculosis*-Zellen, die *tlyA* exprimieren, zeigen eine hohe Zytotoxizität für Lungenepithelzellen (Dobos et al., 2000; McDonough & Kress, 1995). Jedoch ist für *M. bovis* BCG keine erhöhte Zytotoxizität für Lungenepithelzellen A549 (Dobos et al., 2000) und für J774-Makrophagen (Hess et al., 1998) beschrieben worden, obwohl für *M. bovis* BCG die Transkription von *tlyA* nachgewiesen wurde (Wren et al., 1998). Translation und Expressionsstärke dieses Genproduktes wurde für *M. bovis* BCG bisher nicht untersucht. Neben der Expressionsstärke können andere Gene existieren, die Zytotoxizität bewirken und in *M. tuberculosis* vorhanden sind, aber in *M. bovis* BCG fehlen.

Bei der in dieser Arbeit beobachteten Zytotoxizität handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um Apoptose, da eine für apoptotische Zellen typische Fragmentierung der Zelle oder des Zellkerns nicht beobachtet wurde. Für die zytotoxische Wirkung von Listeriolysin wurde durch Infektion von Mausmakrophagen mit *L. monocytogenes* gezeigt, dass diese nicht auf Apoptose beruht (Barsig & Kaufmann, 1997).

Apoptose von Makrophagen, die mit *M. bovis* BCG infiziert wurden, führt zu einer verminderten Überlebensrate der Bakterien verglichen mit *M. bovis* BCG-Zellen in nekrotischen

Makrophagen (Molloy et al., 1994). Die Induktion von Makrophagen-Apoptose kann deshalb als ein Abwehrmechanismus gegen *M. tuberculosis* angesehen werden (Fratazzi et al., 1997; Kornfeld et al., 1999).

## 4.2 Phagosomaler pH

Bereits 1988 wurde durch Chicurel et al. (1988) ein Effekt von mykobakteriellen Proteinen auf den pH-Wert von Lysosomen festgestellt. Crowle et al. (Crowle et al., 1991) konnten drei Jahre später als erste nachweisen, dass die Phagosomen der pathogenen Mykobakterienarten *M. tuberculosis* und *M. avium* nicht angesäuert sind. Die verminderte Ansäuerung der Phagosomen wurde von Sturgill-Koszycki et al. (Sturgill-Koszycki et al., 1994) und Xu et al. (1994) auf den Ausschluss der vesikulären Proton-Adenosine Triphosphatase (V-ATPase) zurückgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden RAW 264.7-Zellen zur Untersuchung der phagosomalen Ansäuerung benutzt. Rathman et al. (1996) konnten eine Ansäuerung des Phagosoms für diese Zelllinie nach Infektion mit *Salmonella typhimurium* nachweisen. RAW 264.7-Zellen können also als ein geeignetes Modell zur Untersuchung der phagosomalen Ansäuerung angesehen werden. Der pH-Wert eines *M. smegmatis*-tragenden Phagosoms in J774-Zellen wird von Kuehn et al. (2001) mit 5,8 eine Stunde und mit 5,4 fünf Stunden nach Infektion angegeben. Der phagosomale pH-Wert von lebenden *M. smegmatis*-Zellen entspricht damit ungefähr dem von abgetöteten pathogenen Mykobakterien (Hackam et al., 1997; Oh & Straubinger, 1996) und dem von avirulenten *M. avium*-Stämmen, der mit 5,5 bis 5,8 angegeben wird (de Chastellier & Thilo, 1999).

In dieser Arbeit konnte durch den Vergleich von *hly* und *tlyA*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen mit dem Wildtyp gezeigt werden, dass diese Transformanten einen höheren pH im Phagosom aufweisen als der Wildtyp. Dass dieser Unterschied im Fluoreszenzverhältnis durch einen unterschiedlichen pH-Wert bedingt ist, ließ sich durch Zugabe von Ammoniumchlorid aufzeigen (Abb. 30, S. 59). Ammoniumchlorid neutralisiert den pH im Phagosom und verhindert eine Fusion von Phagosomen und Lysosomen (Gordon et al., 1980; Ohkuma & Poole, 1978). In Experimenten mit toten *M. smegmatis*-Zellen, *hly/tlyA*-Transformanten und dem Wildtyp wurde deutlich, dass tote Bakterienzellen einen vergleichbaren phagosomalen pH-Wert aufweisen wie der Wildtyp von *M. smegmatis*. *tlyA*- und *hly*-exprimierende Transformanten hingegen weisen einen signifikant höheren pH auf. Vergleicht man die Ergebnisse der Lysotracker-Kolokalisation mit denen von Via et al. (1998), so verhalten sich Wildtyp *M. smegmatis*-Zellen wie beschrieben, während sich *tlyA*- und *hly*-exprimierende

Bakterien wie pathogene Mykobakterien verhalten. Durch die Lysotracker-Versuche kann bestätigt werden, dass der phagosomale pH-Wert signifikant erhöht ist. Für *L. monocytogenes* ist der Zusammenhang von phagosomalem pH-Wert und Listeriolysin-Aktivität aufgezeigt worden (Beauregard et al., 1997). So kommt es bei niedrigem pH auf Grund der Aktivität von Listeriolysin zu einer Permeabilitätssteigerung der phagosomalen Membran und zu einer starken pH-Erhöhung (Beauregard et al., 1997). Für den Vektor pAT261:*hly* ist in verschiedenen bakteriellen Modellen gezeigt worden, dass das Fusionsprotein bestehend aus dem Signalpeptid des mykobakteriellen Alphaantigens, dem Signalpeptid vom *hlyA* (*E. coli*-Hämolysin) und dem *hly* für *E. coli*, *S. dublin* (Gentschev et al., 1995), *Brucella suis* (Köhler et al., 2001) und *M. bovis* BCG (Hess et al., 1998) funktionell aktiv ist. Es muss daher angenommen werden, dass auch *M. smegmatis*-Zellen, die dieses *hly*-Fusionsprotein exprimieren nur kurzzeitig in einem angesäuerten Phagosom vorliegen, das durch die Aktivität von *hly* neutralisiert wird. Dadurch lässt sich der erhöhte phagosomale pH gegenüber dem Wildtyp erklären. Ein vergleichbar hoher pH-Wert liegt auch bei *tlyA*-exprimierenden Transformanten vor.

### 4.3 Präsenz und Permeabilität der phagosomalen Membran

Bielecki et al. (1990) konnten für *B. subtilis* zeigen, dass die Expression von Listeriolysin zur Zerstörung der phagosomalen Membran (*phagosomal escape*) in der murinen Makrophagenzelllinie J774 führt. Ein signifikanter Anteil von 15% von *hly*-exprimierenden *Salmonella dublin*-Zellen und 8% von *hly*-exprimierenden *E. coli* K-12-Zellen lagen nach 3 h frei im Zytoplasma von J774-Zellen vor (Gentschev et al., 1995). Für pathogene Mykobakterien wird die Zerstörung der phagosomalen Membran diskutiert (Leake et al., 1984; McDonough et al., 1993; Mohagheghpour et al., 2000; Myrvik et al., 1984), gilt aber nicht als charakteristisch (Clemens, 1996) und muss möglicherweise als Artefakt gewertet werden (C. de Chastellier, pers. Mitt.).

Die Zerstörung der phagosomalen Membran könnte eine Erklärung für die erhöhte Überlebensrate von *tlyA*- und *hly*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen in Makrophagenkulturen sein, wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden das Vorhandensein der phagosomalen Membran untersucht. Durch Anfärben der phagosomalen Membran mit einem Antikörper gegen das *lysosome-associated membrane (glyco)protein 1* (Lamp-1) konnte diese sichtbar gemacht werden. Es wurde dabei deutlich, dass phagozytierte *M. smegmatis*-Zellen von einer phagosomalen Membran umgeben sind, auch dann, wenn sie *tlyA* oder *hly* exprimieren.

Die Ergebnisse der Lamp-1 Antikörperfärbung ließen sich im Elektronenmikroskop bestätigen. Es konnten auch bei *tlyA*- oder *hly*-Expression 9 h nach der Infektion keine *M. smegmatis*-Zellen frei im Zytoplasma gefunden werden. Außerdem wurde deutlich, dass die Bakterienzellen in ein für Mykobakterien typisches Phagosom gelangen, bei dem wie von Barker et al. (1996) und Wei et al. (2000) beschrieben, die phagosomale Membran sehr eng am Bakterium anliegt und die meisten Phagosomen nur eine Bakterienzelle tragen. Damit unterscheiden sich die Phagosomen deutlich von den Phagosomen in aktivierten Makrophagen. Bei diesen liegt die phagosomale Membran nicht eng an und in den meisten Phagosomen befinden sich mehr als eine Bakterienzelle (Russell et al., 1997).

Bei *hly*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen konnten Veränderungen an der phagosomalen Membran festgestellt werden (Abb. 23, S. Abb. 23). Vergleichbare Abbauerscheinungen der phagosomalen Membran wurden auch für *Brucella suis*-Transformanten beschrieben, die *hly* exprimieren und sezernieren (Köhler et al., 2001). Mohaghehpour et al. (2000) beschreiben für *M. avium*-enthaltende Phagosomen in dendritischen Zellen Brüche in der Membran in ca. 10% der untersuchten Fälle, die bei Makrophagen nicht auftraten. Im Gegensatz zu *M. smegmatis*-Zellen, die *hly* exprimieren, konnten in dieser Arbeit keine Veränderungen der phagosomalen Membran im Elektronenmikroskop bei *tlyA*-exprimierenden *M. smegmatis*-Zellen festgestellt werden.

Für TlyA wird die Bildung von Poren in der phagosomalen Membran, wie unter 4.1 dargestellt, diskutiert. Teitelbaum et al. (1999) berichteten über Permeabilität der phagosomalen Membran bei BMA3.1A7 Zellen, einer murinen Makrophagenzelllinie, nach Phagozytose von *M. bovis* BCG. Die Permeabilität der phagosomalen Membran von pathogenen Mykobakterien ist trotz der Untersuchungen von Teitelbaum et al. (1999) nicht unumstritten (C. de Chastellier und S.H.E. Kaufmann, pers. Mitt.). Ein Grund dafür ist die von Teitelbaum et al. (1999) verwendete Methode, Fluoreszenzfarbstoff in infizierte Makrophagen zu injizieren und diese im Lasermikroskop zu untersuchen. Eine Unterscheidung von Fluoreszenzfarbstoff, der sich ausschließlich im Zytoplasma der eukaryotischen Zelle oder sich im Zytoplasma und im phagosomalen Raum zwischen der eukaryotischen Membran und dem Bakterium befindet, ist aber physikalisch im Lasermikroskop nicht möglich. Es ist deshalb unklar, ob die Ergebnisse von Teitelbaum et al. (1999) auf die Permeabilität der phagosomalen Membran zurückzuführen sind.

Bessere Hinweise auf eine mögliche Permeabilität der phagosomalen Membran ergeben sich aus den elektronenmikroskopischen Arbeiten von Harth et al. (Harth et al., 1996) und Beatty

& Russell (2000). In diesen Arbeiten wurde die Lokalisation sezernierter Proteine von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG in Makrophagen über einen Immunogoldnachweis aufgezeigt. Mykobakterielle Proteine wurden dabei auch außerhalb des Phagosoms nachgewiesen. Die Autoren gehen nicht von einer Permeabilität des Phagosoms für diese Proteine aus, sondern sprechen von zytoplasmatischen Vakuolen, in denen die Proteine lokalisiert sind.

Gegen die Permeabilität spricht auch die Tatsache, dass der phagosomale pH-Wert von pathogenen Mykobakterien zwischen 6,0 und 6,5 (Clemens, 1996; Flynn & Chan, 2001) liegt. Der phagosomale pH-Wert dieser Bakterien liegt damit noch deutlich unter dem zytoplasmatischen pH-Wert (Hackam et al., 1997). Sollte TlyA eine unselektive Pore bilden, so ist schwer vorstellbar, dass über die Membran ein pH-Gradient gebildet werden kann. Eine selektive Pore ist aber ein geeignetes Erklärungsmodell für die Virulenz von Bakterien. So wurde Porenbildung auch für *Legionella pneumophila* beschrieben (Kirby et al., 1998). Der pH-Wert des Phagosoms dieser Erreger liegt mit 6,1 auf dem gleichen Niveau von pathogenen Mykobakterien (Horwitz & Maxfield, 1984). *L. pneumophila* ist damit ein Beispiel für ein pathogenes Bakterium, das Poren ins Phagosom macht, und eine geringe Ansäuerung des Phagosoms aufweist.

Auch wenn die Phagozytose von *L. pneumophila* in einer völlig anderen Weise als die von Mykobakterien verläuft (Horwitz, 1984), gibt es wichtige weitere Gemeinsamkeiten der Pathogenese von *L. pneumophila* und pathogenen Mykobakterien: Auch die Phagosomen von *L. pneumophila* bleiben in einem frühen Stadium der phagosomalen Reifung, Fusion mit Lysosomen wird verhindert, der phagosomale pH-Wert liegt über 6 (Berger et al., 1994; Horwitz, 1983; Horwitz et al., 1984; Roy et al., 1998; Swanson & Isberg, 1996).

Ein anderes Beispiel ist *Neisseria gonorrhoeae*. Die Interaktion eines porenbildenden Proteins, PorB, mit der phagosomalen Membran wurde auch für *Neisseria*-Arten beschrieben (Mosleh et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass sich PorB sowohl in künstliche Membranen (Lynch et al., 1984) als auch in eukaryotische Zellmembranen (Blake & Gotschlich, 1987; Weel & van Putten, 1991) einbaut. Es wurde postuliert, dass die Bildung dieser Pore bei *Neisseria gonorrhoeae* für die Inhibierung der Fusion zwischen Phagosomen und Lysosomen ausreichend ist (Mosleh et al., 1998). Im Gegensatz dazu ist die Porenbildung bei *L. pneumophila* kein ausreichender Mechanismus, um die Fusion von Lysosomen und Phagosomen zu verhindern (Zuckman et al., 1999).

Interessanterweise zeigen die *Rickettsia*-Arten, *R. prowazekii* und *R. conorii*, die ebenfalls ein homologes *tlyA* im Genom besitzen, eine sehr ähnliche Interaktion mit der Wirtszelle wie *L. monocytogenes*: Auflösung der phagosomalen Membran (Silverman & Wisseman, 1979;





Dieses Modell des Phagosoms von pathogenen Mykobakterien (außer *M. ulcerans*) umfasst die folgenden Merkmale:

- Das Phagosom bleibt in einem Stadium, das dem von einem frühen Endosomen entspricht (Guerin & de Chastellier, 2000). Das Ausbleiben der phagosomalen Reifung ist erkennbar daran, dass das TACO-Protein nicht entfernt wird (Ferrari et al., 1999) und die Phagosomen Rab5 positiv, aber Rab7 negativ sind (Fratti et al., 2000; Via et al., 1997).
- Zu einer Fusion des Phagosoms mit späten Endosomen und Lysosomen kommt es nicht (Armstrong & Hart, 1975).
- Zwischen dem Phagosom und den frühen Endosomen und damit zur Zellmembran besteht ein ständiger, wenn auch im Vergleich zu anderen Phagosomen verminderter, Austausch (Clemens & Horwitz, 1995; de Chastellier et al., 1995; Russell et al., 1996; Sturgill-Koszycki et al., 1996).
- Das Phagosom trägt nur vergleichsweise geringe Mengen an V-ATPase, was zu einem pH von ca. 6,1 führt (Crowle et al., 1991; Hackam et al., 1998; Hackam et al., 1997; Oh & Straubinger, 1996).
- Durch den ständigen Austausch von Membranmaterial haben die Phagosomen eine Konzentration an Transferrin-Rezeptor, die der Konzentration in der Zellmembran vergleichbar ist (Clemens & Horwitz, 1995). Ein Zusammenhang zwischen dem engen Kontakt der phagosomalen Membran und der Zellwand des Bakteriums wird diskutiert (de Chastellier & Thilo, 1997).
- In das Phagosom gelangen Procathepsin D und sehr geringe Mengen an Cathepsin D (Ullrich et al., 1999).
- Mykobakterielle Proteine gelangen in Vesikel aus dem Phagosom (Beatty & Russell, 2000; Harth et al., 1996).
- Das Phagosom ist für Moleküle bis zu einer Größe von 70 kD permeabel (Teitelbaum et al., 1999).

Das hier zusammengefasste Modell soll durch eine mögliche Funktion des TlyA ergänzt werden. Die folgenden Hypothesen müssen experimentell überprüft werden:

- TlyA bildet eine Pore in der phagosomalen Membran.
- Diese Pore bewirkt eine verminderte Ansäuerung des Phagosoms.

- Durch diese Pore können mykobakterielle Proteine und/oder andere Substanzen ins Zytoplasma des Makrophagen gelangen.
- Sezernierte mykobakterielle Proteine, die über TlyA ins Zytoplasma gelangen, sind möglicherweise für die Veränderung der Aktinfilamente, wie sie für *M. avium* beschrieben wurde (Guerin & de Chastellier, 2000), verantwortlich.
- Mykobakterielle Proteine verhindern oder verändern möglicherweise die Phosphorylierung von Makrophagenproteinen. Eine verminderte Phosphorylierung von Nukleolin wurde bei THP-1-Zellen nach Infektion mit *M. avium* festgestellt (Garcia et al., 2000). Eine veränderte Phosphorylierung von Makrophagenproteinen kann auch dafür verantwortlich sein, dass die Phagosomen nicht reifen. So verändert sich die Phosphorylierung der phagosomalen Proteine während des Reifungsprozesses stark (Emans et al., 1996).

Ob Porenbildung für das TlyA angenommen werden kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Diese Frage lässt sich durch Expression von *tlyA* in *M. smegmatis* alleine nicht klären. Die Herstellung und Charakterisierung einer *M. bovis* BCG *tlyA* negativen Mutante würde mehr Information über die Funktion dieses Genes liefern, konnte in dieser Arbeit aber nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Die Charakterisierung der Funktion von *tlyA* sollte durch die *M. tuberculosis tlyA* negativen Mutante, die von Hinds et al. (1999) und von Parish & Stockes (2000) beschrieben wurden, sowie das in dieser Arbeit hergestellte rekombinante *tlyA* mit 6 Histidinen am C-terminalen Ende möglich sein.

#### 4.4 Suche nach phagosomal-induzierten Promotoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Promotor-Such-System aufgebaut, dass auf zwei Genen beruht, deren Expression einerseits einen positiven Selektionsfaktor in Makrophagenkulturen darstellt, wie unter 3.2 dargestellt und unter 4.1 diskutiert wurde und andererseits auf einem Negativ-Selektionsfaktor. Als Positiv-Selektionsfaktor wurde das Gen *hly* benutzt. Als negativer Selektionsfaktor diente das Wildtyp-Allel des *rpsL*.

Dieses System ist vergleichbar mit IVET, *in vivo expression technology*, die von Mahan et al. (1993) für *Salmonella typhimurium* vorgestellt wurde. Die IVE-Technologie beruht auf der Komplementation einer auxotrophen Mutante mit einem Gen, das die Auxotrophie aufhebt (Mahan et al., 1993; Slauch et al., 1994). Dieses Gen stellt dann einen positiven Selektionsfaktor für den entsprechenden auxotrophen Stamm dar und kann benutzt werden, um induzier-

te Promotoren aus dem Genom zu selektieren. In dieser Arbeit wurde *M. smegmatis* mit dem hämolytischen Gen *hly* ‚komplementiert‘, das für *M. smegmatis* in Makrophagenkulturen einen positiven Selektionsfaktor darstellt.

IVET wurde für *Pseudomonas aeruginosa* (Wang et al., 1996), *Staphylococcus aureus* (Lowe et al., 1998), *Vibrio cholerae* (Camilli & Mekalanos, 1995), *Pseudomonas fluorescens* (Preston et al., 2001) und *Klebsiella pneumoniae* (Lai et al., 2001) angewandt. Gahan & Hill (2000) haben die IVET dahingehend verändert, dass ein Virulenzgen komplementiert wurde. Dafür wurde wie in dieser Arbeit Listeriolysin benutzt, um eine Erhöhung der Überlebensrate in Makrophagen zu erreichen. Eine abgewandelte Form der IVET wurde für *M. tuberculosis* angewendet (Smith et al., 1998).

Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die gesamte genomische DNA-Bank oder Aliquots davon in einem Ansatz untersucht werden können und nicht, wie bei der von Marston & Shinnick (1996) durchgeführten Promotorsuche, jeder Klon einzeln untersucht werden muss.

Von Valdivia & Falkow (1997) wurde eine Methode vorgestellt, mit deren Hilfe es möglich ist, Klone einer genomischen DNA-Bank, die phagosomal-induzierten Promotoren tragen, auf Grund unterschiedlicher GFP-Expression im FACS zu selektieren. Diese Methode wird DFI, *differential fluorescence induction*, genannt und wurde für *M. marinum* (Barker et al., 1998; Ramakrishnan et al., 2000) und *M. tuberculosis* angewendet (Triccas et al., 1999). Auch bei der DFI-Methode werden die Klone in einem Ansatz untersucht. Ein Nachteil der Zellsortierung mittels FACS liegt in der Anfälligkeit für Artefakte. So weisen Makrophagen eine hohe Autofluoreszenz auf (Edelson et al., 1985), was die Selektion von Klonen anhand der GFP-Fluoreszenz erschwert. Außerdem ist die Identifizierung von konstitutiven Promotoren anhand der GFP-Expression schwer möglich. Beispielsweise waren *M. smegmatis* und *M. bovis* BCG Klone, die GFP unter der Kontrolle des HSP60-Promotors bzw. des *rpsL*-Promotors exprimieren, nur im Mikroskop deutlich unterscheidbar von Klonen, die kein GFP exprimierten, nicht jedoch bei Beurteilung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines 488 nm Transilluminators. Dieses Problem wurde von Triccas et al. (1999) durch die Gegenselektion mit *sacB* umgangen. SacB ist ein Protein, das bei verschiedenen Bakterien und so auch bei Mykobakterien auf Saccharose supplementierten Platten zum Zelltod führt (Pelicic et al., 1996).

In dieser Arbeit wurde ein anderes Gen zur Gegenselektion verwendet. Der hier angewandte negative Selektionsfaktor ist das Wildtyp-Allel des *rpsL* Genes, das auf mit Streptomycin supplementierten Platten zu Sensitivität der Transformanten führt (Sander et al., 1995).

Während des Screenings kam es zu zahlreichen Rekombinationsereignissen, die bei Analyse der reisolierten Vektoren evident wurden. Soweit untersucht, hatte das Vorhandensein eines Promotors auf das Auftreten von Rekombinationsereignissen keinen Einfluss. Dieses Ergebnis ist aus mehreren Gründen unerwartet: Zum einen wurde der Ausgangsvektor pAT 261:*hly* und der Vektor pAT 261:*lacZ* auf Rekombinationsereignisse getestet und keine Rekombination mittels Restriktionsanalyse festgestellt (Daten nicht gezeigt). Zum anderen wurde von Hinshelwood & Stoker (1992) ein Vektor vorgestellt, mit dem Cosmid-Banken in *M. smegmatis* transferiert werden können. Die Größe der Insertionsfragmente liegt dabei zwischen 30 und 42 kb und damit deutlich über der Größe des Vektors pTRAP. Nach Hinshelwood & Stoker (1992) kam es nicht zu Rekombinationsereignissen zwischen den Cosmiden und dem Genom. Dieses Verfahren wurde von verschiedenen Autoren benutzt (Averill et al., 1993; Bange et al., 1999; Bona et al., 1997; Gormley et al., 1999; Hackbarth et al., 1997; Hinshelwood & Stoker, 1992; Miller & Shinnick, 2001; Ramakrishnan et al., 1997). Hierbei wurden *recA* negative Mutanten, wie sie von Frischkorn et al. (1998) und Papavinasasundaram et al. (1998) beschrieben wurden, nicht verwendet. Auch in Publikationen, bei denen wesentlich kleinere Vektoren benutzt wurden (Miller & Shinnick, 2000; Wei et al., 2000), wurden keine Rekombinationsereignisse festgestellt, obwohl auch RecA-unabhängige Rekombination für Mykobakterien gezeigt wurde (Springer et al., 2001).

In jedem Fall stellt die genetische Instabilität von Mykobakterien ein Problem dar. Ob in den Untersuchungen weniger oder keine Rekombination stattfand oder ob das verwendete Plasmid pTRAP im Vergleich zu anderen Plasmiden eine erhöhte Rekombinationsrate aufweist, kann hier nicht geklärt werden. Möglicherweise ist das *rpsL*, wenn es als Selektionsfaktor benutzt wird, ein bevorzugter Angriffspunkt für Rekombination. Unklar bleibt auch, warum manche Klone nach dem Screening keine Rekombinationsereignisse aufwiesen wie die Klone 21, 34 bis 42 und der Klon 4.

Wie sich bereits nach der Transformation der genomischen Bank zeigte, wachsen Transformanten mit Promotor langsamer als Transformanten ohne Promotor. Dies war deutlich anhand der Koloniegröße kleiner blauer und großer weißer Kolonien zu erkennen (Abb. 42, S. 71). Dieser Effekt kann nicht bzw. nicht ausschließlich aus dem toxischen Effekt, den das enzymatisch umgesetzte x-gal hat (P. Roberts, pers. Mitt.), erklärt werden. So wachsen Transformanten mit konstitutivem Promotor auch in einer Flüssigkultur, die nicht mit x-gal supplementiert ist, signifikant langsamer (Abb. 51, S. 81). Es wäre deshalb anzunehmen, dass bei einem Versagen des negativen Selektionsfaktors, Klone ohne konstitutiven Promotor Klone mit konstitutiven Promotoren überwachsen.

Durch das hier angewendete Promotorer-Such-System aber konnten ausschließlich Promotoren isoliert werden, die auch extrazelluläre Promotoraktivität zeigen. Dies macht deutlich, dass mit Hilfe des verwendeten Negativselektionsfaktors, dem Wildtyp-Allel des *rpsL*-Genes, es nicht gelingt alle konstitutiven Promotoren auszuschließen. Die mangelnde Stringenz des negativen Selektionsfaktors ist möglicherweise dadurch bedingt, dass ein Abtöten von Transformanten, die beide Allele des *rpsL*-Genes tragen nur dann möglich ist, wenn das Wildtyp-Allel unter der Kontrolle eines starken Promotors steht. So zeigte sich beim Vergleich der Promotorstärken, dass der *rpsL*-Promotor unter den untersuchten Bedingungen einer der stärksten Promotoren war. Offensichtlich kommt der Selektionseffekt des *rpsL* Wildtyp-Allels nicht zum Tragen, wenn dieses unter der Kontrolle eines schwächeren Promotors steht.

Aus der Tatsache, dass Klone ohne extrazelluläre Promotoraktivität das Screening nicht überleben, kann deshalb ein wesentlicher Selektionsvorteil für Klone, die Promotoren mit extrazellulärer Aktivität aufweisen, abgeleitet werden. Dass konstitutiv *hly*-exprimierende *M. smegmatis*-Zellen einen Überlebensvorteil haben, wurde in dieser Arbeit durch verschiedene Experimente gezeigt (3.2, S. 39). Ein Überlebensvorteil von *M. smegmatis*-Zellen, die *hly* ausschließlich intrazellulär exprimieren, konnte nicht untersucht werden, da keine phagosomal-induzierten *M. smegmatis*-Promotoren, weder mit noch ohne extrazellulärer Aktivität, bekannt sind. Die Tatsache, dass ausschließlich Klone mit Promotoren überleben, die auch extrazellulär Aktivität zeigen, kann zwei Ursachen haben: 1. Klone mit ausschließlich intrazellulär aktiven Promotoren haben intrazellulär einen Selektionsnachteil (s.u.), oder 2. das Genom von *M. smegmatis* trägt keine Promotoren, die ausschließlich intrazellulär aktiv sind. Für das Fehlen von Promotoren mit ausschließlich intrazellulärer Aktivität spricht, dass zwei Promotoren, die in pathogenen Mykobakterien ausschließlich intrazellulär aktiv sind, der *sigE*-Promotor aus *M. tuberculosis* (Graham & Clark-Curtiss, 1999) und der *cysD*-Promotor aus *M. bovis* BCG (Triccas et al., 1999) in *M. smegmatis* extrazelluläre Aktivität aufweisen und trotzdem phagosomal-induziert sind.

Möglicherweise lassen sich *M. smegmatis*-Promotoren, die ausschließlich intrazelluläre Aktivität aufweisen, mit Hilfe von Listeriolysin nicht identifizieren. Interessanterweise wird Listeriolysin in *L. monocytogenes* konstitutiv exprimiert und im Phagosom herunterreguliert (Moors et al., 1999). Man kann deshalb vermuten, dass eine induzierte Listeriolysin-Expression zu langsam ist, um einen deutlichen Überlebensfaktor darzustellen, bzw. dass bereits während der Phagozytose das Protein exprimiert sein muss, eine deutlich Wirkung zu erzielen.

Für einen der beiden isolierten Klone, den Klon 4, konnte durch Sequenzierung und funktionelle Promotoraktivität gezeigt werden, dass dieser den *ahpC*-Promotor trägt. Das Genprodukt des *ahpC*-Genes ist die Alkylhydroperoxidase (AhpC). AhpC von *M. tuberculosis* wurde biochemisch charakterisiert (Hillas et al., 2000). Es liegt in seiner nativen Struktur als 10- bis 12mer vor, katalysiert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einem Km-Wert von 1500 µM und das Substrat mit der größten Spezifität ist Cholesterolhydroperoxid (Hillas et al., 2000).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Virulenz von *M. bovis* (nicht *M. bovis* BCG) und einer Verhinderung der *ahpC*-Expression in einem Antisense-RNA-Ansatz wurde im Meer-schweinchenmodell bewiesen (Wilson et al., 1998). Andererseits wurde für *M. tuberculosis* gezeigt, dass Geninaktivierung durch homologen Austausch von *ahpC* nicht zu einer verminderten Virulenz in Mäusen führt (Springer et al., 2001).

Für das Fragment, das den *ahpC*-Promotor trägt, konnte eine Induktion durch RAW 264.7-Zellen sowohl nach 4 h als auch nach 8 h erfasst werden. Ein Induktor des *ahpC*-Promotors ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 56, S. 85). Im Gegensatz zu dieser Stressinduktion haben ein verminderter pH-Wert und Hitzeschock keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität (Abb. 57 und Abb. 58).

Die Sequenzierung der Insertionssequenz des Klones 21 und der Klone 34 bis 42 ergaben eine hohe Übereinstimmung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um einen Klon handelt. Für das Promotor tragende Fragment des Klons 21 konnte eine starke Homologie zu einer Region stromaufwärts eines offenen Leserasters von *M. tuberculosis* gezeigt werden, bei dem es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Oxidoreduktase handelt. Dieses offene Leseraster ist das erste von fünf offenen Leserastern, die in der gleichen Orientierung liegen. Die Dichteabfolge der offenen Leseraster legt die Vermutung nah, dass es sich um ein Operon handelt. Das zweite offene Leseraster kodiert das Protein MoeA, das wahrscheinlich an der Biosynthese von Molybdopterin beteiligt ist. *moaB*, ein weiteres Gen, das an der Biosynthese von Molybdopterin beteiligt ist, wurde mittels IVET bei *M. tuberculosis* identifiziert und mit dessen Virulenz in Verbindung gebracht (Smith et al., 1998).

#### 4.5 Induktion von mykobakteriellen Promotoren durch Mikromilieufaktoren

Die Expression von Virulenzfaktoren ist oft durch bestimmte Mikromilieufaktoren induziert (Mekalanos, 1992; Moors & Portnoy, 1995). Aus diesem Grund wurde die Induktion verschiedener Promotoren in *M. smegmatis* durch veränderte Mikromilieubedingungen erfasst.

Wu et al. (1997) konnten zeigen, dass *M. smegmatis* Mutanten die *sigE* nicht exprimieren können, eine verminderte Überlebensrate bei oxidativem und pH-Stress aufweisen. Diese Experimente belegen bereits die Bedeutung von *sigE* für die Stressreaktion von *M. smegmatis*. Anhand der Promotorstärke des *sigE*-Promotors ließ sich der Zusammenhang zwischen oxidativem und pH-Stress einerseits und *sigE*-Expression andererseits verdeutlichen und quantifizieren. Eine Induktion des *sigE*-Promotors durch eine Erhöhung der Temperatur war bei *M. smegmatis* nicht erkennbar (Abb. 58, S. 87). Eine Anpassung wie im Fall des oxidativen oder des pH-Stresses war nicht erkennbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass *sigE* bei *M. smegmatis* nicht oder nur in sehr geringem Maß der Reaktion auf eine Erhöhung der Temperatur dient. Bei *M. tuberculosis* steigt die mRNA-Konzentration von *sigE* lediglich um den Faktor 3, die von *sigB* um den Faktor 23, die von *sigH* um das Zwanzigfache (Manganelli et al., 1999). SigH wurde als der Sigma-Faktor identifiziert, der an den *sigE*-Promotor bindet (Raman et al., 2001). Es ist deshalb anzunehmen, dass weitere regulatorische Proteine für die *sigE*-Expression von Bedeutung sind.

Dhandayuthapani et al. (1996) zeigten nach Auftrennung auf einem Proteingel, dass *ahpC* sowohl durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cumene-Hydroperoxid also auch durch tert-Butylhydroperoxid bei *M. smegmatis* induziert wird. Auch auf mRNA-Ebene wurde eine Induktion von *ahpC* durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *M. smegmatis* erfasst (Sherman et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine durch Wasserstoffperoxid-induzierbare Promotoraktivität auf dem Genomfragment lokalisiert ist, welches stromaufwärts des *ahpC*-Genes liegt. Dieses Fragment trägt den von Dhandayuthapani et al. (1996) aufgezeigten Transkriptionsstart.

*M. tuberculosis* lässt auf Proteinebene keine *ahpC*-Expression erkennen (Dhandayuthapani et al., 1996; Springer et al., 2001). Sherman et al. (1995) konnten Transkription in dieser Mykobakterienart aufzeigen. Ob in *M. tuberculosis* zwar *ahpC*-mRNA gebildet wird, diese aber nicht translatiert wird, müssen weitere Untersuchungen zeigen.



## 4.6 Extrazelluläre und intrazelluläre Promotorstärken

Die Tatsache, dass auch 8 h nach Infektion die *rpsL*-Expression intrazellulär auf vergleichbarem Niveau liegt wie die extrazelluläre Expressionsrate, macht deutlich, dass *M. smegmatis* durch die Mikromilieubedingungen, die im Phagosom vorliegen, wenigstens zunächst nicht übermäßig geschädigt wird. Bei einem schnellen Abtöten der Bakterien, wie es bei *B. subtilis* der Fall ist (de Chastellier & Lang, 1984; Lang et al., 1988), würde auch sehr schnell die GFP-Expression zurückgehen. Dass *M. smegmatis*-Zellen differenziert auf die phagosomalen Mikromilieubedingungen reagieren können wird deutlich durch die Induktion von *ahpC* und *sigE*.

Der HSP60-Promotor zeigte nach 4 h eine signifikante Induktion, während nach 8 h kein deutlicher Unterschied zwischen der extra- und intrazellulären Expression mehr erkennbar war. Dieses Expressionsprofil stimmt mit dem von Batoni et al. (1998) für die Expression des HSP60-Promotors in *M. avium* nach Phagozytose überein. So kommt es auch bei *M. avium* nach 3 h zu einer signifikanten Induktion des HSP60-Promotors, die nach einem Tag wieder zurückgeht (Batoni et al., 1998).

Die Induktion des extrazytoplasmatischen Sigma-Faktors *sigE* wurde bisher für *M. tuberculosis* (Graham & Clark-Curtiss, 1999; Manganelli et al., 1999), aber nicht für *M. smegmatis* aufgezeigt. Interessanterweise ist der Promotor der putativen Sulfat-Adenylattransferase aus *M. tuberculosis* auch in *M. smegmatis* phagosomal-induziert. *cysD* steht in *M. tuberculosis* unter der Kontrolle des Sigma-Faktors E (Manganelli et al., 2001). Es kann daher ein kausaler Zusammenhang zwischen der intrazellulären Induktion von *sigE* und der Induktion von Genen, die unter der Kontrolle dieses Sigma-Faktors stehen, angenommen werden.

Für das Promotor tragende DNA-Fragment der Klon 21 wurde durch die Messung mit *lacZ* und *luxAB* keine Induktion durch RAW 264.7-Zellen gemessen. Extrazellulär ist die Promotorstärke der des *ahpC*-Promotor vergleichbar.

Die intrazelluläre Induktion des *ahpC*-Promotors ist für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung, da sie bestätigt, dass das Ziel des Promotor-Such-Systems, phagosomal-induzierte Promotoren herauszuselektieren, erreicht wurde. Diese Induktion ist im Gegensatz zur Induktion des HSP60-Promotors nicht nur temporär, sondern über viele Stunden andauernd. So war das Expressionsniveau des *ahpC*-Promotors auch noch 8 h nach Infektion intrazellulär höher als extrazellulär. 8 h nach der Infektion liegt die Expressionsrate des *ahpC*-Promotors signifikant höher als die des HSP60-Promotors oder des *rpsL*-Promotors. Der *ahpC*-Promotor zeigt

damit gute Eigenschaften zur Expression von Genen, die gezielt in phagozytierten *M. smegmatis*-Zellen untersucht werden sollen.

In *M. tuberculosis* wurde keine Expression von *ahpC* festgestellt (Dhandayuthapani et al., 1996; Springer et al., 2001). Es konnte auch keine intrazelluläre Induktion des *ahpC*-Promotors aufgezeigt werden (Springer et al., 2001). Obwohl *M. bovis* und *M. tuberculosis* zur selben Genospezies gehören, dem *M. tuberculosis*-Komplex, zeigt *M. bovis* BCG ein Expressionsprofil für *ahpC*, das dem von *M. smegmatis* sehr ähnlich ist: Starke Expression extrazellulär und Induktion intrazellulär, die zu einer höheren Expressionsrate führt verglichen mit dem HSP60-Promotor (Springer et al., 2001). Der *ahpC*-Promotor ist damit sowohl in *M. bovis* BCG, als auch in *M. smegmatis* gut geeignet um eine starke Proteinexpression in Makrophagen zu bewirken. Eine dauerhafte Expression auf hohem Niveau ist, sowohl für die Untersuchung der Interaktion von Mykobakterien und Makrophagen, als auch für die Entwicklung von Impfstoffen vom großer Bedeutung (Triccas et al., 2001).

Die Tatsache, dass Promotoren, die in pathogenen Mykobakterien durch das Mikromilieu des Phagosoms induziert sind, auch eine Induktion in *M. smegmatis* aufweisen, wie der *cysD*-, der *ahpC*- und der *sigE*-Promotor, macht deutlich, dass *M. smegmatis* auch für diesen Aspekt der Pathogenese von Mykobakterien als Modellorganismus benutzt werden kann.

## 5 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Melkonian für die Betreuung dieser Arbeit und dafür, dass er sich immer wieder Zeit genommen hat, sich in das Thema intensiv einzudenken und mir kreative Anregungen gegeben hat. Die Zuversicht, die er mir während der Arbeit geben hat, war für mich eine Quelle der Inspiration und Motivation. Herrn Prof. Dr. Martin Krönke möchte ich in außerordentlicher Weise danken. Ohne das Vertrauen, das er in mich und meine Arbeit investiert hat, ohne das wissenschaftliche Umfeld und die finanzielle Unterstützung, die er mir gegeben hat und vielleicht auch ohne seine z.T. harte, faire Kritik, wäre diese Arbeit undenkbar gewesen.

Diese Arbeit wäre auch nicht vorstellbar ohne das Labor-Team von Herrn PD Dr. Georg Plum: Herrn Dr. Christian Morszeck danke ich dafür, dass er mir das Klonieren beigebracht hat und viele, viele Dinge mehr, sowie für das freundschaftliche Verhältnis, das unsere gemeinsame Arbeit bestimmt hat. Frau Christiane Haefs möchte ich sehr danke für die Sequenzierungen, die sie für mich vorgenommen hat, für ihre gute Laune und ihren trocknen Humor. Frau Martina Wolke danke ich für den Westernblot, den sie für mich angefertigt hat und dafür, dass sie immer ein Auge auf die Ordnung im Labor hatte. Herrn DP Dr. Plum möchte ich sehr danken für die Arbeit, die er in Arbeitsgruppe, ins Labor und im speziellen in mein Projekt gesteckt hat, für die zahlreichen, immer spannenden Diskussionen und besonders für seine Hilfe am Ende dieser Arbeit. Frau Dr. Chantal de Chastellier danke ich für die Hilfe und die Arbeit, die sie in die elektronenmikroskopischen Teil dieser Arbeit gesteckt hat. Herrn Dr. Jürgen Hess danke ich für den Vektor pAT261:hly. Herrn Dr. Francisco Rivero danke ich für die Hilfe bei der Lasermikroskopie. Auch speziell danken möchte ich Herrn Dr. Olek Krut, Frau Katja Krönke-Wiegmann, Herrn Dr. Katussevani Bernardo, Herrn Hamid Kashkar, Frau Dr. Jürgensmeier, Herrn Dr. Olaf Utermöhlen, Herrn Dr. Frank Hüniger und Herrn Norbert Pakulat.

Für die Liebe und Zuneigung während dieser Arbeit möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Freunden und ganz besonders bei meiner lieben Lebensgefährtin Beatrix bedanken.

## 6 Literatur

- Aderem, A., and Underhill, D. M.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.
- Alexeyev, M. F., and Shokolenko, I. N.** (1995). Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of gram-negative bacteria. *Gene* 160, 59-62.
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., and Croughan, T. P.** (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160, 63-7.
- Allen, L. A., Schlesinger, L. S., and Kang, B.** (2000). Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp Med* 191, 115-28.
- Appelberg, R., and Sarmiento, A. M.** (1990). The role of macrophage activation and of Bcg-encoded macrophage function(s) in the control of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Clin Exp Immunol* 80, 324-31.
- Armstrong, J. A., and Hart, P. D.** (1975). Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual non-fusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 142, 1-16.
- Astarie-Dequeker, C., N'Diaye, E. N., Le Cabec, V., Rittig, M. G., Prandi, J., and Maridonneau-Parini, I.** (1999). The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* 67, 469-77.
- Averill, L. E., Cavallo, U., Wallis, R. S., Boom, W. H., Bona, M., Mincek, M., Pascopella, L., Jacobs, W. R., Jr., and Ellner, J. J.** (1993). Screening of a cosmid library of *Mycobacterium bovis* BCG in *Mycobacterium smegmatis* for novel T-cell stimulatory antigens. *Res Microbiol* 144, 349-62.
- Bange, F. C., Collins, F. M., and Jacobs, W. R., Jr.** (1999). Survival of mice infected with *Mycobacterium smegmatis* containing large DNA fragments from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 79, 171-80.
- Barker, K., Fan, H., Carroll, C., Kaplan, G., Barker, J., Hellmann, W., and Cohn, Z. A.** (1996). Nonadherent cultures of human monocytes kill *Mycobacterium smegmatis*, but adherent cultures do not. *Infect Immun* 64, 428-33.
- Barker, L. P., Brooks, D. M., and Small, P. L.** (1998). The identification of *Mycobacterium marinum* genes differentially expressed in macrophage phagosomes using promoter fusions to green fluorescent protein. *Mol Microbiol* 29, 1167-77.

- Barry, R. A., Bouwer, H. G., Portnoy, D. A., and Hinrichs, D. J.** (1992). Pathogenicity and immunogenicity of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun* *60*, 1625-32.
- Barsig, J., and Kaufmann, S. H.** (1997). The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect Immun* *65*, 4075-81.
- Bashyam, M. D., Kaushal, D., Dasgupta, S. K., and Tyagi, A. K.** (1996). A study of mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *J Bacteriol* *178*, 4847-53.
- Bashyam, M. D., and Tyagi, A. K.** (1998). Identification and analysis of "extended -10" promoters from mycobacteria. *J Bacteriol* *180*, 2568-73.
- Batoni, G., Bottai, D., Maisetta, G., Pardini, M., Boschi, A., Florio, W., Esin, S., and Campa, M.** (2001). Involvement of the *Mycobacterium tuberculosis* secreted antigen SA-5K in intracellular survival of recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* *205*, 125-9.
- Batoni, G., Maisetta, G., Florio, W., Freer, G., Campa, M., and Senesi, S.** (1998). Analysis of the *Mycobacterium bovis* hsp60 promoter activity in recombinant *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol Lett* *169*, 117-24.
- Beatty, W. L., and Russell, D. G.** (2000). Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun* *68*, 6997-7002.
- Beauregard, K. E., Lee, K. D., Collier, R. J., and Swanson, J. A.** (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* *186*, 1159-63.
- Berger, K. H., and Isberg, R. R.** (1993). Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* *7*, 7-19.
- Berger, K. H., Merriam, J. J., and Isberg, R. R.** (1994). Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* dotA gene. *Mol Microbiol* *14*, 809-22.
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., and Portnoy, D. A.** (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* *345*, 175-6.
- Blake, M. S., and Gotschlich, E. C.** (1987). Functional and immunological properties of pathogenic *Neisseria* surface proteins. In *Bacterial Outer Membranes as Model Systems*, M. Inouye, ed. (New York: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 377-400.
- Bloom, B. R., and Murray, C. J.** (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* *257*, 1055-64.

- Bona, M., Nayak, R., Wu, M., Mincek, M., and Ellner, J. J.** (1997). Immunological screening of a genomic *M. bovis* BCG library expressed in *M. smegmatis* and identification of the *M. bovis* BCG analog of ClpB. *Tuber Lung Dis* 78, 133-41.
- Brand, B. C., Sadosky, A. B., and Shuman, H. A.** (1994). The *Legionella pneumophila* icm locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages. *Mol Microbiol* 14, 797-808.
- Brettle, R. P.** (1997). *Mycobacterium avium* intracellular infection in patients with HIV or AIDS. *J Antimicrob Chemother* 40, 156-60.
- Brzychcy, M., Andrzejczyk, Z., Zalewska, N., Zwolska, Z., and Rudnicka, W.** (1997). Haemolytic activity of *Mycobacterium* spp. *Acta Microbiol Pol* 46, 377-85.
- Camacho, L. R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., and Guilhot, C.** (1999). Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 34, 257-67.
- Camilli, A., and Mekalanos, J. J.** (1995). Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection. *Mol Microbiol* 18, 671-83.
- Carroll, M. C.** (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 16, 545-68.
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., and Zerial, M.** (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62, 317-29.
- Chicurel, M., Garcia, E., and Goodsaid, F.** (1988). Modulation of macrophage lysosomal pH by *Mycobacterium tuberculosis*-derived proteins. *Infect Immun* 56, 479-83.
- Chimini, G., and Chavrier, P.** (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* 2, E191-6.
- Clapper, W. E., and Whitcomb, J.** (1967). *Mycobacterium fortuitum* abscess at injection site. *Jama* 202, 550.
- Clemens, D. L.** (1996). Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Trends Microbiol* 4, 113-8.
- Clemens, D. L., and Horwitz, M. A.** (1995). Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 181, 257-70.
- Clemens, D. L., and Horwitz, M. A.** (1996). The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med* 184, 1349-55.

- Clemens, D. L., Lee, B. Y., and Horwitz, M. A. (2000).** Mycobacterium tuberculosis and Legionella pneumophila phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. *Infect Immun* 68, 5154-66.
- Clemens, D. L., Lee, B. Y., and Horwitz, M. A. (1995).** Purification, characterization, and genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *J Bacteriol* 177, 5644-52.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., and Vannuffel, P. (1994).** Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 7, 328-45.
- Collins, D. M. (1996).** In search of tuberculosis virulence genes. *Trends Microbiol* 4, 426-30.
- Collins, F. M. (1989).** Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Microbiol Rev* 2, 360-77.
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk, K., and Alfano, J. R. (2000).** Pseudomonas syringae Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8770-7.
- Cossart, P. (1988).** The listeriolysin O gene: a chromosomal locus crucial for the virulence of Listeria monocytogenes. *Infection* 16, S157-9.
- Cox, D., Chang, P., Kurosaki, T., and Greenberg, S. (1996).** Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J Biol Chem* 271, 16597-602.
- Crowe, L. M., Spargo, B. J., Ionedo, T., Beaman, B. L., and Crowe, J. H. (1994).** Interaction of cord factor (alpha, alpha'-trehalose-6,6'-dimycolate) with phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1194, 53-60.
- Crowle, A. J., Dahl, R., Ross, E., and May, M. H. (1991).** Evidence that vesicles containing living, virulent Mycobacterium tuberculosis or Mycobacterium avium in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun* 59, 1823-31.
- Crowle, A. J., Tsang, A. Y., Vatter, A. E., and May, M. H. (1986).** Comparison of 15 laboratory and patient-derived strains of Mycobacterium avium for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. *J Clin Microbiol* 24, 812-21.
- Cywes, C., Godenir, N. L., Hoppe, H. C., Scholle, R. R., Steyn, L. M., Kirsch, R. E., and Ehlers, M. R. (1996).** Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* 64, 5373-83.
- Cywes, C., Hoppe, H. C., Daffe, M., and Ehlers, M. R. (1997).** Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun* 65, 4258-66.

- Daeron, M.** (1997). Structural bases of Fc gamma R functions. *Int Rev Immunol* 16, 1-27.
- de Chastellier, C., and Lang, T.** (1984). Exchange of material between the extracellular medium and macrophage phagosomes containing different species of bacteria including mycobacteria. *Acta Leprol* 2, 249-57.
- de Chastellier, C., Lang, T., and Thilo, L.** (1995). Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, *Mycobacterium avium*, in comparison to phagosomes which contain *Bacillus subtilis* or latex beads. *Eur J Cell Biol* 68, 167-82.
- de Chastellier, C., and Thilo, L.** (1998). Modulation of phagosome processing as a key strategy for *Mycobacterium avium* survival within macrophages. *Res Immunol* 149, 699-702.
- de Chastellier, C., and Thilo, L.** (1999). Mycobacteria and the endocytic pathway. In *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles*, S. Gordon, ed. (NY: JAI Press Inc.), pp. 107-135.
- de Chastellier, C., and Thilo, L.** (1997). Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol* 74, 49-62.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K. N.** (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172, 6568-72.
- Dellagostin, O. A., Wall, S., Norman, E., O'Shaughnessy, T., Dale, J. W., and McFadden, J.** (1993). Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. *Mol Microbiol* 10, 983-93.
- Deretic, V., and Fratti, R. A.** (1999). *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol Microbiol* 31, 1603-9.
- Deshpande, R. G., Khan, M. B., Bhat, D. A., and Navalkar, R. G.** (1998). Haemolysin from *Mycobacterium avium* complex isolates from AIDS patients. *J Med Microbiol* 47, 365-7.
- Desjardins, M.** (1995). Biogenesis of Phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* 5, 183-186.
- Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G., and Griffiths, G.** (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124, 677-88.
- Dhandayuthapani, S., Zhang, Y., Mudd, M. H., and Deretic, V.** (1996). Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria: characterization and inducibility of *ahpC* by peroxides in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aurum* and *M. tuberculosis*. *J Bacteriol* 178, 3641-9.



- Dobos, K. M., Spotts, E. A., Quinn, F. D., and King, C. H.** (2000). Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect Immun* 68, 6300-10.
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., and Raviglione, M. C.** (1999). Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* 282, 677-86.
- Edelson, J. D., MacFadden, D. K., Klein, M., and Rebuck, A. S.** (1985). Autofluorescence of alveolar macrophages: problems and potential solutions. *Med Hypotheses* 17, 403-7.
- Emans, N., Nzala, N. N., and Desjardins, M.** (1996). Protein phosphorylation during phagosome maturation. *FEBS Lett* 398, 37-42.
- Falcone, V., Bassey, E., Jacobs, W., Jr., and Collins, F.** (1995). The immunogenicity of recombinant *Mycobacterium smegmatis* bearing BCG genes. *Microbiology* 141, 1239-45.
- Fazal, N.** (1997). Influence of *Mycobacterium tuberculosis* catalase gene (KatG) expression on nitric oxide production and the intracellular growth of transfected *Mycobacterium smegmatis* strains within murine macrophages. *Biochem Mol Biol Int* 42, 135-42.
- Feng, Y., Press, B., and Wandinger-Ness, A.** (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131, 1435-52.
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., and Pieters, J.** (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97, 435-47.
- Figura, N., and Valassina, M.** (1999). *Helicobacter pylori* determinants of pathogenicity. *J Chemother* 11, 591-600.
- Flynn, J. L., and Chan, J.** (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19, 93-129.
- Fratuzzi, C., Arbeit, R. D., Carini, C., and Remold, H. G.** (1997). Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* 158, 4320-7.
- Fratti, R. A., Vergne, I., Chua, J., Skidmore, J., and Deretic, V.** (2000). Regulators of membrane trafficking and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block. *Electrophoresis* 21, 3378-85.
- Frehel, C., de Chastellier, C., Lang, T., and Rastogi, N.** (1986). Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 52, 252-62.

- Frehel, C., de Chastellier, C., Offredo, C., and Berche, P.** (1991). Intramacrophage growth of *Mycobacterium avium* during infection of mice. *Infect Immun* 59, 2207-14.
- Fridovich, I.** (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-80.
- Frischkorn, K., Sander, P., Scholz, M., Teschner, K., Prammananan, T., and Bottger, E. C.** (1998). Investigation of mycobacterial recA function: protein introns in the RecA of pathogenic mycobacteria do not affect competency for homologous recombination. *Mol Microbiol* 29, 1203-14.
- Gahan, C. G., and Hill, C.** (2000). The use of listeriolysin to identify in vivo induced genes in the gram-positive intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 36, 498-507.
- Garcia, R. C., Banfi, E., and Pittis, M. G.** (2000). Infection of macrophage-like THP-1 cells with *Mycobacterium avium* results in a decrease in their ability to phosphorylate nucleolin. *Infect Immun* 68, 3121-8.
- Gentschev, I., Sokolovic, Z., Mollenkopf, H. J., Hess, J., Kaufmann, S. H., Kuhn, M., Krohne, G. F., and Goebel, W.** (1995). *Salmonella* strain secreting active listeriolysin changes its intracellular localization. *Infect Immun* 63, 4202-5.
- Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Alouf, J. E., and Berche, P.** (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 55, 1641-6.
- Gomez, A., Mve-Obiang, A., Vray, B., Rudnicka, W., Shamputa, I. C., Portaels, F., Meyers, W. M., Fonteyne, P. A., and Realini, L.** (2001). Detection of phospholipase C in nontuberculous mycobacteria and its possible role in hemolytic activity. *J Clin Microbiol* 39, 1396-401.
- Gonzalez-y-Merchand, J. A., Garcia, M. J., Gonzalez-Rico, S., Colston, M. J., and Cox, R. A.** (1997). Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *J Bacteriol* 179, 6949-58.
- Gordon, A. H., Hart, P. D., and Young, M. R.** (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286, 79-80.
- Goren, M. B., D'Arcy Hart, P., Young, M. R., and Armstrong, J. A.** (1976). Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2510-4.
- Gormley, E., Fray, L., Sandall, L., Ke, G., Dupont, C., and Carpenter, E.** (1999). Detection of *Mycobacterium bovis* lymphocyte stimulating antigens in culture filtrates of a recombinant *Mycobacterium smegmatis* cosmid library. *Vaccine* 17, 2792-801.
- Graham, J. E., and Clark-Curtiss, J. E.** (1999). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by

- selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11554-9.
- Gros, P., Skamene, E., and Forget, A.** (1981). Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J Immunol* 127, 2417-21.
- Guerin, I., and de Chastellier, C.** (2000). Disruption of the actin filament network affects delivery of endocytic contents marker to phagosomes with early endosome characteristics: the case of phagosomes with pathogenic mycobacteria. *Eur J Cell Biol* 79, 735-49.
- Guerin, I., and de Chastellier, C.** (2000). Pathogenic mycobacteria disrupt the macrophage actin filament network. *Infect Immun* 68, 2655-62.
- Haas, A., and Goebel, W.** (1992). Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radic Res Commun* 16, 137-57.
- Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Schreiber, A., Zhang, W., and Grinstein, S.** (1997). Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcgamma receptors in macrophages. *J Exp Med* 186, 955-66.
- Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Zhang, W., Gruenheid, S., Gros, P., and Grinstein, S.** (1998). Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nrampl) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* 188, 351-64.
- Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Zhang, W. J., Demaurex, N., Woodside, M., Tsai, O., and Grinstein, S.** (1997). Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, and vacuolar-type H<sup>+</sup>-atpases. *J Biol Chem* 272, 29810-20.
- Hackbarth, C. J., Unsal, I., and Chambers, H. F.** (1997). Cloning and sequence analysis of a class A beta-lactamase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1182-5.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., and Tschape, H.** (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23, 1089-97.
- Harley, C. B., and Reynolds, R. P.** (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 15, 2343-61.
- Harth, G., Lee, B. Y., Wang, J., Clemens, D. L., and Horwitz, M. A.** (1996). Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 64, 3038-47.
- Hasan, Z., Schlax, C., Kuhn, L., Lefkovits, I., Young, D., Thole, J., and Pieters, J.** (1997). Isolation and characterization of the mycobacterial phagosome: segregation from the endosomal/lysosomal pathway. *Mol Microbiol* 24, 545-53.

- Heinzen, R. A., Hayes, S. F., Peacock, M. G., and Hackstadt, T.** (1993). Directional actin polymerization associated with spotted fever group Rickettsia infection of Vero cells. *Infect Immun* 61, 1926-35.
- Hess, J., Miko, D., Catic, A., Lehmensiek, V., Russell, D. G., and Kaufmann, S. H.** (1998). Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of Listeria monocytogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5299-304.
- Hess, J., Miko, D., Catic, A., Lehmensiek, V., Russell, D. G., and Kaufmann, S. H.** (1998). Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of Listeria monocytogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5299-304.
- Hillas, P. J., del Alba, F. S., Oyarzabal, J., Wilks, A., and Ortiz De Montellano, P. R.** (2000). The AhpC and AhpD antioxidant defense system of Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem* 275, 18801-9.
- Hinds, J., Mahenthiralingam, E., Kempell, K. E., Duncan, K., Stokes, R. W., Parish, T., and Stoker, N. G.** (1999). Enhanced gene replacement in mycobacteria. *Microbiology* 145, 519-27.
- Hinshelwood, S., and Stoker, N. G.** (1992). Cloning of mycobacterial histidine synthesis genes by complementation of a Mycobacterium smegmatis auxotroph. *Mol Microbiol* 6, 2887-95.
- Hinshelwood, S., and Stoker, N. G.** (1992). An Escherichia coli-Mycobacterium shuttle cosmid vector, pMSC1. *Gene* 110, 115-8.
- Horwitz, M. A.** (1983). The Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 158, 2108-26.
- Horwitz, M. A.** (1984). Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 36, 27-33.
- Horwitz, M. A., Levis, W. R., and Cohn, Z. A.** (1984). Defective production of monocyte-activating cytokines in lepromatous leprosy. *J Exp Med* 159, 666-78.
- Horwitz, M. A., and Maxfield, F. R.** (1984). Legionella pneumophila inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* 99, 1936-43.
- Hsu, T., Hutto, D. L., Minion, F. C., Zuerner, R. L., and Wannemuehler, M. J.** (2001). Cloning of a beta-hemolysin gene of Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae and its expression in Escherichia coli. *Infect Immun* 69, 706-11.
- Hyatt, D. R., and Joens, L. A.** (1997). Analysis of the lytic activity of the Serpulina hyodysenteriae hemolysin. *Infect Immun* 65, 4877-9.
- Hyatt, D. R., and Joens, L. A.** (1997). Functional analysis of Serpulina hyodysenteriae hemolysin lytic activity. *Adv Exp Med Biol* 412, 259-62.

- Hyatt, D. R., ter Huurne, A. A., van der Zeijst, B. A., and Joens, L. A.** (1994). Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect Immun* 62, 2244-8.
- Jones, R.** (1989). Review of the economic impact of Johne's disease in the United States. In *Johne's Disease. Current Trends in Research, Diagnosis and Management*, A. R. Miller and P. R. Wood, eds. (Melbourne, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation), pp. 46-50.
- Kaper, J. B.** (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 1, 103-8.
- Kaplan, G.** (1977). Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol* 6, 797-807.
- Kenney, T. J., and Churchward, G.** (1994). Cloning and sequence analysis of the *rpsL* and *rpsG* genes of *Mycobacterium smegmatis* and characterization of mutations causing resistance to streptomycin. *J Bacteriol* 176, 6153-6.
- Kenney, T. J., and Churchward, G.** (1996). Genetic analysis of the *Mycobacterium smegmatis rpsL* promoter. *J Bacteriol* 178, 3564-71.
- King, C. H., Mundayoor, S., Crawford, J. T., and Shinnick, T. M.** (1993). Expression of contact-dependent cytolytic activity by *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of the genomic locus that encodes the activity. *Infect Immun* 61, 2708-12.
- Kirby, J. E., Vogel, J. P., Andrews, H. L., and Isberg, R. R.** (1998). Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 27, 323-36.
- Köhler, S., Layssac, M., Naroeni, A., Gentschev, I., Rittig, M., and Liautard, J. P.** (2001). Secretion of listeriolysin by *Brucella suis* inhibits its intramacrophagic replication. *Infect Immun* 69, 2753-6.
- Kornfeld, H., Mancino, G., and Colizzi, V.** (1999). The role of macrophage cell death in tuberculosis. *Cell Death Differ* 6, 71-8.
- Kuehnel, M. P., Goethe, R., Habermann, A., Mueller, E., Rohde, M., Griffiths, G., and Valentin-Weigand, P.** (2001). Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cell Microbiol* 3, 551-66.
- Kuhn, M., and Goebel, W.** (1989). Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* 57, 55-61.
- Labo, M., Gusberti, L., Rossi, E. D., Speziale, P., and Riccardi, G.** (1998). Determination of a 15437 bp nucleotide sequence around the *inhA* gene of *Mycobacterium avium* and similarity analysis of the products of putative ORFs. *Microbiology* 144, 807-14.

- Lai, Y. C., Peng, H. L., and Chang, H. Y.** (2001). Identification of Genes Induced In Vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 Infection. *Infect Immun* 69, 7140-5.
- Lang, T., de Chastellier, C., Ryter, A., and Thilo, L.** (1988). Endocytic membrane traffic with respect to phagosomes in macrophages infected with non-pathogenic bacteria: phagosomal membrane acquires the same composition as lysosomal membrane. *Eur J Cell Biol* 46, 39-50.
- Leake, E. S., Myrvik, Q. N., and Wright, M. J.** (1984). Phagosomal membranes of *Mycobacterium bovis* BCG-immune alveolar macrophages are resistant to disruption by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Infect Immun* 45, 443-6.
- Lee, C. A.** (1996). Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infect Agents Dis* 5, 1-7.
- Lee, M. H., Pascopella, L., Jacobs, W. R., Jr., and Hatfull, G. F.** (1991). Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration- proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3111-5.
- Leusen, J. H. W., Verhoeven, A. J., and Roos, D.** (1996). Interactions between the components of the human NADPH oxidase: A review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci* 1, d72-90.
- Levy-Frebault, V. V., and Portaels, F.** (1992). Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 42, 315-23.
- Li, M. S., Monahan, I. M., Waddell, S. J., Mangan, J. A., Martin, S. L., Everett, M. J., and Butcher, P. D.** (2001). cDNA-RNA subtractive hybridization reveals increased expression of mycocerosic acid synthase in intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology* 147, 2293-305.
- Libby, S. J., Goebel, W., Ludwig, A., Buchmeier, N., Bowe, F., Fang, F. C., Guiney, D. G., Songer, J. G., and Heffron, F.** (1994). A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 489-93.
- Lowe, A. M., Beattie, D. T., and Deresiewicz, R. L.** (1998). Identification of novel staphylococcal virulence genes by in vivo expression technology. *Mol Microbiol* 27, 967-76.
- Ludwig, A., Tengel, C., Bauer, S., Bubert, A., Benz, R., Mollenkopf, H. J., and Goebel, W.** (1995). SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 249, 474-86.
- Lynch, E. C., Blake, M. S., Gotschlich, E. C., and Mauro, A.** (1984). Studies on porins: spontaneously transferred from whole cells and from proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Biophys. J.* 45, 104-107.

- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C., and Stover, C. K.** (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* *178*, 1274-82.
- Mahan, M. J., Slauch, J. M., and Mekalanos, J. J.** (1993). Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* *259*, 686-8.
- Mahenthiralingam, E., Draper, P., Davis, E. O., and Colston, M. J.** (1993). Cloning and sequencing of the gene which encodes the highly inducible acetamidase of *Mycobacterium smegmatis*. *J Gen Microbiol* *139*, 575-83.
- Malik, Z. A., Denning, G. M., and Kusner, D. J.** (2000). Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med* *191*, 287-302.
- Malo, D., and Skamene, E.** (1994). Genetic control of host resistance to infection. *Trends Genet* *10*, 365-71.
- Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F. R., and Smith, I.** (1999). Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* *31*, 715-24.
- Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., and Smith, I.** (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol* *41*, 423-37.
- Mariani, F., Cappelli, G., Riccardi, G., and Colizzi, V.** (2000). *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv comparative gene-expression analysis in synthetic medium and human macrophage. *Gene* *253*, 281-91.
- Marra, A., Blander, S. J., Horwitz, M. A., and Shuman, H. A.** (1992). Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 9607-11.
- Marston, B. J., and Shinnick, T. M.** (1996). Differentially expressed genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann N Y Acad Sci* *797*, 32-41.
- Martino, M. C., Stabler, R. A., Zhang, Z. W., Farthing, M. J., Wren, B. W., and Dorrell, N.** (2001). *Helicobacter pylori* pore-forming cytolysin orthologue TlyA possesses in vitro hemolytic activity and has a role in colonization of the gastric mucosa. *Infect Immun* *69*, 1697-703.
- Maslow, J. N., Dawson, D., Carlin, E. A., and Holland, S. M.** (1999). Hemolysin as a virulence factor for systemic infection with isolates of *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol* *37*, 445-6.
- McDonough, K. A., and Kress, Y.** (1995). Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* *63*, 4802-11.

- McDonough, K. A., Kress, Y., and Bloom, B. R.** (1993). Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* *61*, 2763-73.
- Mekalanos, J. J.** (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* *174*, 1-7.
- Meyer, M., von Grunberg, P. W., Knoop, T., Hartmann, P., and Plum, G.** (1998). The macrophage-induced gene *mig* as a marker for clinical pathogenicity and in vitro virulence of *Mycobacterium avium* complex strains. *Infect Immun* *66*, 4549-52.
- Miller, B. H., and Shinnick, T. M.** (2000). Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in resistance to killing by human macrophages. *Infect Immun* *68*, 387-90.
- Miller, B. H., and Shinnick, T. M.** (2001). Identification of two *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ORFs involved in resistance to killing by human macrophages. *BMC Microbiol* *1*, 26.
- Moayeri, M., and Welch, R. A.** (1994). Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* *62*, 4124-34.
- Mohaghehpour, N., van Vollenhoven, A., Goodman, J., and Bermudez, L. E.** (2000). Interaction of *Mycobacterium avium* with human monocyte-derived dendritic cells. *Infect Immun* *68*, 5824-9.
- Molloy, A., Laochumroonvorapong, P., and Kaplan, G.** (1994). Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med* *180*, 1499-509.
- Moors, M. A., Levitt, B., Youngman, P., and Portnoy, D. A.** (1999). Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* *67*, 131-9.
- Moors, M. A., and Portnoy, D. A.** (1995). Identification of bacterial genes that contribute to survival and growth in an intracellular environment. *Trends Microbiol* *3*, 83-5.
- Morscheck, C., Berger, S., and Plum, G.** (2001). The macrophage-induced gene (*mig*) of *Mycobacterium avium* encodes a medium-chain acyl-coenzyme A synthetase. *Biochim Biophys Acta* *1521*, 59-65.
- Mosleh, I. M., Huber, L. A., Steinlein, P., Pasquali, C., Gunther, D., and Meyer, T. F.** (1998). *Neisseria gonorrhoeae* porin modulates phagosome maturation. *J Biol Chem* *273*, 35332-8.
- Muir, S., Koopman, M. B., Libby, S. J., Joens, L. A., Heffron, F., and Kusters, J. G.** (1992). Cloning and expression of a *Serpula* (*Treponema*) *hyodysenteriae* hemolysin gene. *Infect Immun* *60*, 529-35.



- Mulder, M. A., Zappe, H., and Steyn, L. M.** (1997). Mycobacterial promoters. *Tuber Lung Dis* 78, 211-23.
- Mundayoor, S., and Shinnick, T. M.** (1994). Identification of genes involved in the resistance of mycobacteria to killing by macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 730, 26-36.
- Myrvik, Q. N., Leake, E. S., and Wright, M. J.** (1984). Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. A correlate of virulence. *Am Rev Respir Dis* 129, 322-8.
- Oettinger, T., and Andersen, A. B.** (1994). Cloning and B-cell-epitope mapping of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Infect Immun* 62, 2058-64.
- Oh, Y. K., and Straubinger, R. M.** (1996). Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. *Infect Immun* 64, 319-25.
- Ohkuma, S., and Poole, B.** (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3327-31.
- Pagan-Ramos, E., Song, J., McFalone, M., Mudd, M. H., and Deretic, V.** (1998). Oxidative stress response and characterization of the *oxyR-ahpC* and *furA-katG* loci in *Mycobacterium marinum*. *J Bacteriol* 180, 4856-64.
- Paget, M. S., Kang, J. G., Roe, J. H., and Buttner, M. J.** (1998). *sigmaR*, an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Embo J* 17, 5776-82.
- Papavinasundaram, K. G., Colston, M. J., and Davis, E. O.** (1998). Construction and complementation of a *recA* deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* reveals that the intein in *Mycobacterium tuberculosis recA* does not affect RecA function. *Mol Microbiol* 30, 525-34.
- Parish, T., and Stoker, N. G.** (2000). Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC* mutant by gene replacement. *Microbiology* 146, 1969-75.
- Pellicic, V., Reytrat, J. M., and Gicquel, B.** (1996). Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* 178, 1197-9.
- Pfeffer, S. R.** (1994). Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 6, 522-6.
- Pieters, J.** (2001). Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 3, 249-55.
- Plum, G., Brenden, M., Clark-Curtiss, J. E., and Pulverer, G.** (1997). Cloning, sequencing, and expression of the *mig* gene of *Mycobacterium avium*, which codes for a secreted macrophage-induced protein. *Infect Immun* 65, 4548-57.

- Plum, G., and Clark Curtiss, J. E.** (1994). Induction of *Mycobacterium avium* gene expression following phagocytosis by human macrophages. *Infect-Immun* 62, 476-83.
- Poelarends, G. J., Kulakov, L. A., Larkin, M. J., van Hylekama Vlieg, J. E., and Janssen, D. B.** (2000). Roles of horizontal gene transfer and gene integration in evolution of 1,3-dichloropropene- and 1,2-dibromoethane-degradative pathways. *J Bacteriol* 182, 2191-9.
- Porte, F., Liautard, J. P., and Kohler, S.** (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 67, 4041-7.
- Portnoy, D. A., Chakraborty, T., Goebel, W., and Cossart, P.** (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 60, 1263-7.
- Portnoy, D. A., Tweten, R. K., Kehoe, M., and Bielecki, J.** (1992). Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of *Bacillus subtilis* within mammalian cells. *Infect Immun* 60, 2710-7.
- Post, F. A., Manca, C., Neyrolles, O., Ryffel, B., Young, D. B., and Kaplan, G.** (2001). *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits *Mycobacterium smegmatis*-induced cytokine production by human macrophages in vitro. *Infect Immun* 69, 1433-9.
- Poyart, C., Pellegrini, E., Gaillot, O., Boumaila, C., Baptista, M., and Trieu-Cuot, P.** (2001). Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 69, 5098-106.
- Preston, G. M., Bertrand, N., and Rainey, P. B.** (2001). Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Mol Microbiol* 41, 999-1014.
- Prinzis, S., Rivoire, B., and Brennan, P. J.** (1994). Search for the molecular basis of morphological variation in *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 62, 1946-51.
- Ralph, P., and Nakoinz, I.** (1977). Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J Immunol* 119, 950-54.
- Ramakrishnan, L., Federspiel, N. A., and Falkow, S.** (2000). Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science* 288, 1436-9.
- Ramakrishnan, L., Tran, H. T., Federspiel, N. A., and Falkow, S.** (1997). A crtB homolog essential for photochromogenicity in *Mycobacterium marinum*: isolation, characterization, and gene disruption via homologous recombination. *J Bacteriol* 179, 5862-8.
- Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W. R., Jr., and Husson, R. N.** (2001). The Alternative Sigma Factor SigH Regulates Major Components of Oxi-

- dative and Heat Stress Responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 183, 6119-25.
- Ranes, M. G., Rauzier, J., Lagranderie, M., Gheorghiu, M., and Gicquel, B.** (1990). Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: construction of a "mini" mycobacterium-*Escherichia coli* shuttle vector. *J Bacteriol* 172, 2793-7.
- Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., and Cook, G. M.** (2001). Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology* 147, 1017-24.
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I.** (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261-7.
- Rathman, M., Sjaastad, M. D., and Falkow, S.** (1996). Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun* 64, 2765-73.
- Rauzier, J., Moniz-Pereira, J., and Gicquel-Sanzey, B.** (1988). Complete nucleotide sequence of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene* 71, 315-21.
- Ravetch, J. V.** (1997). Fc receptors. *Curr Opin Immunol* 9, 121-5.
- Ravetch, J. V.** (1994). Fc receptors: rubor redux. *Cell* 78, 553-60.
- Ravetch, J. V., and Clynes, R. A.** (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol* 16, 421-32.
- Reth, M.** (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-4.
- Reyrat, J. M., and Kahn, D.** (2001). *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? *Trends Microbiol* 9, 472-4.
- Rowe, G. E., and Welch, R. A.** (1994). Assays of hemolytic toxins. *Methods Enzymol* 235, 657-67.
- Roy, C. R., Berger, K. H., and Isberg, R. R.** (1998). *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol* 28, 663-74.
- Rupper, A., Grove, B., and Cardelli, J.** (2001). Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 114, 2449-60.
- Russell, D. G., Dant, J., and Sturgill-Koszycki, S.** (1996). *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol* 156, 4764-73.

- Russell, D. G., Sturgill-Koszycki, S., Vanheyningen, T., Collins, H., and Schaible, U. E.** (1997). Why intracellular parasitism need not be a degrading experience for *Mycobacterium*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1303-10.
- Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M. C., Goody, R., and Zerial, M.** (1996). GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* 383, 266-9.
- Ryter, A., Frehel, C., Rastogi, N., and David, H. L.** (1984). Macrophage interaction with mycobacteria including *M. leprae*. *Acta Leprol* 2, 211-26.
- Safranek, T. J., Jarvis, W. R., Carson, L. A., Cusick, L. B., Bland, L. A., Swenson, J. M., and Silcox, V. A.** (1987). *Mycobacterium chelonae* wound infections after plastic surgery employing contaminated gentian violet skin-marking solution. *N Engl J Med* 317, 197-201.
- Sander, P., Meier, A., and Bottger, E. C.** (1995). *rpsL*<sup>+</sup>: a dominant selectable marker for gene replacement in mycobacteria. *Mol Microbiol* 16, 991-1000.
- Sander, P., Meier, A., and Bottger, E. C.** (1995). *rpsL*<sup>+</sup>: a dominant selectable marker for gene replacement in mycobacteria. *Mol Microbiol* 16, 991-1000.
- Schlesinger, L. S.** (1993). Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150, 2920-30.
- Schlesinger, L. S., Bellinger-Kawahara, C. G., Payne, N. R., and Horwitz, M. A.** (1990). Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* 144, 2771-80.
- Schlesinger, L. S., Hull, S. R., and Kaufman, T. M.** (1994). Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* 152, 4070-9.
- Schlesinger, P. H.** (1994). Measuring the pH of pathogen-containing phagosomes. *Methods Cell Biol* 45, 289-311.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., and Heesemann, J.** (1998). Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* 66, 480-5.
- Schuller, S., Neefjes, J., Ottenhoff, T., Thole, J., and Young, D.** (2001). Coronin is involved in uptake of *Mycobacterium bovis* BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. *Cell Microbiol* 3, 785-93.
- Sengelov, H.** (1995). Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev Immunol* 15, 107-31.
- Sherman, D. R., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Arain, T. M., Mahairas, G. G., Yuan, Y., Barry, C. E., 3rd, and Stover, C. K.** (1995). Disparate responses to oxidative

- stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6625-9.
- Shinnick, T. M., and Good, R. C.** (1994). Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13, 884-901.
- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. D.** (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16, 7583-600.
- Sibley, L. D., Lawson, R., and Weidner, E.** (1986). Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 19, 83-7.
- Silverman, D. J., and Wisseman, C. L., Jr.** (1979). In vitro studies of rickettsia-host cell interactions: ultrastructural changes induced by *Rickettsia rickettsii* infection of chicken embryo fibroblasts. *Infect Immun* 26, 714-27.
- Slauch, J. M., Mahan, M. J., and Mekalanos, J. J.** (1994). In vivo expression technology for selection of bacterial genes specifically induced in host tissues. *Methods Enzymol* 235, 481-92.
- Smith, I., Dussurget, O., Rodriguez, G. M., Timm, J., Gomez, M., Dubnau, J., Gold, B., and Manganeli, R.** (1998). Extra and intracellular expression of *Mycobacterium tuberculosis* genes. *Tuber Lung Dis* 79, 91-7.
- Smith, M. B., Schnadig, V. J., Boyars, M. C., and Woods, G. L.** (2001). Clinical and pathologic features of *Mycobacterium fortuitum* infections. An emerging pathogen in patients with AIDS. *Am J Clin Pathol* 116, 225-32.
- Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T., and Jacobs, W. R., Jr.** (1990). Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 4, 1911-9.
- Snewin, V. A., Gares, M. P., Gaora, P. O., Hasan, Z., Brown, I. N., and Young, D. B.** (1999). Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. *Infect Immun* 67, 4586-93.
- Spargo, B. J., Crowe, L. M., Ionedo, T., Beaman, B. L., and Crowe, J. H.** (1991). Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 737-40.
- Springer, B., Master, S., Sander, P., Zahrt, T., McFalone, M., Song, J., Papavinasundaram, K. G., Colston, M. J., Boettger, E., and Deretic, V.** (2001). Silencing of oxidative stress response in *Mycobacterium tuberculosis*: expression patterns of *ahpC* in virulent and avirulent strains and effect of *ahpC* inactivation. *Infect Immun* 69, 5967-73.
- Springer, B., Sander, P., Sedlacek, L., Ellrott, K., and Bottger, E. C.** (2001). Instability and site-specific excision of integration-proficient mycobacteriophage L5 plasmids: development of stably maintained integrative vectors. *Int J Med Microbiol* 290, 669-75.

- Stahl, P. D., and Ezekowitz, R. A.** (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 10, 50-5.
- Stokes, R. W., and Doxsee, D.** (1999). The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. *Cell Immunol* 197, 1-9.
- Stover, C. K., Bansal, G. P., Hanson, M. S., Burlein, J. E., Palaszynski, S. R., Young, J. F., Koenig, S., Young, D. B., Sadziene, A., and Barbour, A. G.** (1993). Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. *J Exp Med* 178, 197-209.
- Sturgill-Koszycki, S., Schaible, U. E., and Russell, D. G.** (1996). *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *Embo J* 15, 6960-8.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J., and Russell, D. G.** (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263, 678-81.
- Suarez, M., and Russmann, H.** (1998). Molecular mechanisms of *Salmonella* invasion: the type III secretion system of the pathogenicity island 1. *Int Microbiol* 1, 197-204.
- Swanson, M. S., and Isberg, R. R.** (1996). Analysis of the intracellular fate of *Legionella pneumophila* mutants. *Ann N Y Acad Sci* 797, 8-18.
- Talaat, A. M., Reimschuessel, R., and Trucksis, M.** (1997). Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Vet Microbiol* 58, 229-37.
- Talaat, A. M., Trucksis, M., Kane, A. S., and Reimschuessel, R.** (1999). Pathogenicity of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carassius auratus*. *Vet Microbiol* 66, 151-64.
- Teitelbaum, R., Cammer, M., Maitland, M. L., Freitag, N. E., Condeelis, J., and Bloom, B. R.** (1999). Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15190-5.
- ter Huurne, A. A., Muir, S., van Houten, M., van der Zeijst, B. A., Gaastra, W., and Kusters, J. G.** (1994). Characterization of three putative *Serpulina* hyodysenteriae hemolysins. *Microb Pathog* 16, 269-82.
- ter Huurne, A. A., van Houten, M., Muir, S., Kusters, J. G., van der Zeijst, B. A., and Gaastra, W.** (1992). Inactivation of a *Serpula* (*Treponema*) hyodysenteriae hemolysin gene by homologous recombination: importance of this hemolysin in pathogenesis in mice. *FEMS Microbiol Lett* 71, 109-13.

- Teyssie, N., Boudier, J. A., and Raoult, D.** (1995). *Rickettsia conorii* entry into Vero cells. *Infect Immun* 63, 366-74.
- Teyssie, N., Chiche-Portiche, C., and Raoult, D.** (1992). Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* based on actin polymerization. *Res Microbiol* 143, 821-9.
- Tizard, M., Bull, T., Millar, D., Doran, T., Martin, H., Sumar, N., Ford, J., and Hermon-Taylor, J.** (1998). A low G+C content genetic island in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *silvaticum* with homologous genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 144, 3413-23.
- Triccas, J. A., Berthet, F. X., Pelicic, V., and Gicquel, B.** (1999). Use of fluorescence induction and sucrose counterselection to identify *Mycobacterium tuberculosis* genes expressed within host cells. *Microbiology* 145, 2923-30.
- Triccas, J. A., Britton, W. J., and Gicquel, B.** (2001). Isolation of strong expression signals of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 147, 1253-8.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K.** (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-6.
- Ullrich, H. J., Beatty, W. L., and Russell, D. G.** (1999). Direct delivery of procathepsin D to phagosomes: implications for phagosome biogenesis and parasitism by *Mycobacterium*. *Eur J Cell Biol* 78, 739-48.
- Unkeless, J. C., Shen, Z., Lin, C. W., and DeBeus, E.** (1995). Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIB. *Semin Immunol* 7, 37-44.
- Valdivia, R. H., and Falkow, S.** (1996). Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol* 22, 367-78.
- Valdivia, R. H., and Falkow, S.** (1997). Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277, 2007-11.
- Via, L. E., Deretic, D., Ulmer, R. J., Hibler, N. S., Huber, L. A., and Deretic, V.** (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* 272, 13326-31.
- Via, L. E., Fratti, R. A., McFalone, M., Pagan-Ramos, E., Deretic, D., and Deretic, V.** (1998). Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci* 111, 897-905.
- Walker, D. H., Feng, H. M., and Popov, V. L.** (2001). Rickettsial phospholipase A2 as a pathogenic mechanism in a model of cell injury by typhus and spotted fever group rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg* 65, 936-42.

- Wang, J., Mushegian, A., Lory, S., and Jin, S.** (1996). Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by in vivo selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10434-9.
- Weel, J. F., and van Putten, J. P.** (1991). Fate of the major outer membrane protein P.IA in early and late events of gonococcal infection of epithelial cells. *Res Microbiol* 142, 985-93.
- Wei, J., Dahl, J. L., Moulder, J. W., Roberts, E. A., O'Gaora, P., Young, D. B., and Friedman, R. L.** (2000). Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene that enhances mycobacterial survival in macrophages. *J Bacteriol* 182, 377-84.
- Wiele, B., Ottenhoff, T. H., Steenwijk, T. M., Franken, K. L., de Vries, R. R., and Langermans, J. A.** (1997). Increased intracellular survival of *Mycobacterium smegmatis* containing the *Mycobacterium leprae* thioredoxin-thioredoxin reductase gene. *Infect Immun* 65, 2537-41.
- Wilson, T., de Lisle, G. W., Marcinkeviciene, J. A., Blanchard, J. S., and Collins, D. M.** (1998). Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AhpC* of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology* 144, 2687-95.
- Winchester, B. G.** (2001). Lysosomal membrane proteins. *Europ J Paediatr Neurol* 5, 11-9.
- Wren, B. W., Stabler, R. A., Das, S. S., Butcher, P. D., Mangan, J. A., Clarke, J. D., Casali, N., Parish, T., and Stoker, N. G.** (1998). Characterization of a haemolysin from *Mycobacterium tuberculosis* with homology to a virulence factor of *Serpulina hyodysenteriae*. *Microbiology* 144, 1205-11.
- Wu, Q. L., Kong, D., Lam, K., and Husson, R. N.** (1997). A mycobacterial extracytoplasmic function sigma factor involved in survival following stress. *J Bacteriol* 179, 2922-9.
- Xu, S., Cooper, A., Sturgill-Koszycki, S., van Heyningen, T., Chatterjee, D., Orme, I., Allen, P., and Russell, D. G.** (1994). Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol* 153, 2568-78.
- Yamamoto, K., Katsuda, N., Himeno, M., and Kato, K.** (1979). Cathepsin D of rat spleen. Affinity purification and properties of two types of cathepsin D. *Eur J Biochem* 95, 459-67.
- Yasuda, Y., Kageyama, T., Akamine, A., Shibata, M., Kominami, E., Uchiyama, Y., and Yamamoto, K.** (1999). Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *J Biochem (Tokyo)* 125, 1137-43.
- Zuckman, D. M., Hung, J. B., and Roy, C. R.** (1999). Pore-forming activity is not sufficient for *Legionella pneumophila* phagosome trafficking and intracellular growth. *Mol Microbiol* 32, 990-1001.



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Michael Melkonian betreut worden.

Köln, den 17. Mai 2002

Sven Berger

## 7 Lebenslauf, Sven Berger

Wohnort	Nikolausstr. 100, 50937 Köln
Geboren:	25.05.1969 in Köln
Familienstand:	ledig
1975-1990	Schulbesuch in Köln. Abitur 1990
1990-1991	Zivildienst für die evangelischen Kirche Köln-Junkersdorf
1991-1997	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin. Diplom-Abschluss Januar 1997. Titel der Diplomarbeit: „Saisonalität und Diversität des Phytoplanktons im Grimnitzsee 1995“
1997-2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene